

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PRIORITY DOCUMENT

REC'D 09 SEP 1991  
WIPO PCT

## Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in 6507 Ingelheim und die Firma GENENTECH, INC. in South San Francisco, Calif. (V.St.A.) haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

**"Neue Protein-Polykation-Konjugate"**

am 29. März 1991 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 29. März 1991 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K 15/28, C 07 K 15/04, C 12 N 1/15, C 12 N 15/63 und A 61 K 31/70 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. August 1991

Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag

Keller

Zeichen: P 41 10 410.2

Case 14/009

DI Farn/rst

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH  
6507 Ingelheim (BRD)

GENENTECH, INC.  
South San Francisco, California 94080 (USA)

Neue Protein-Polykation-Konjugate

Die Erfindung betrifft neue Protein-Polykation-Konjugate für den Transport von zu Polykationen affinen Verbindungen, insbesondere Nukleinsäuren, in menschliche oder tierische Zellen.

Nukleinsäuren als therapeutisch wirksame Substanzen haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Antisense RNAs und -DNAs haben sich als wirksame Mittel für die selektive Inhibierung bestimmter Gensequenzen erwiesen. Ihre Wirkungsweise ermöglicht ihre Anwendung als Therapeutika zur Blockierung der Expression bestimmter Gene (wie deregulierter Onkogene oder viraler Gene) in vivo. Es wurde bereits gezeigt, daß kurze Antisense- Oligonukleotide in Zellen importiert werden und dort ihre inhibierende Wirkung ausüben können (Zamecnik et al., 1986), wenngleich ihre intrazelluläre Konzentration, u.a. wegen ihrer beschränkten Aufnahme durch die Zellmembran auf Grund der starken negativen Ladung der Nukleinsäuren, gering ist.

Ein weiterer Ansatz zur selektiven Inhibierung von Genen besteht in der Anwendung von Ribozymen. Auch hier besteht das Bedürfnis, eine möglichst hohe Konzentration von aktiven Ribozymen in der Zelle zu gewährleisten, wofür der Transport in die Zelle einer der limitierenden Faktoren ist.

Es wurden bereits mehrere Lösungen vorgeschlagen, den Transport von Nukleinsäuren in lebende Zellen, der bei deren therapeutischer Anwendung einen der limitierenden Faktoren darstellt, zu verbessern.

Einer dieser Lösungswege besteht in direkten Modifikationen der Nukleinsäuren, z.B. durch Substitution der geladenen Phosphodiestergruppen durch ungeladene Gruppen. Eine weitere Möglichkeit der direkten Modifikation besteht in der Verwendung von Nukleosidanalogen.

Wenn auch einige dieser Vorschläge einen grundsätzlich vielversprechenden Ansatz der Lösung des Problems darstellen, weisen sie doch verschiedene Nachteile auf, z.B. geringere Bindung an das Zielmolekül, geringere Hemmwirkung, mögliche Toxizität.

Ein alternativer Ansatz zur direkten Modifikation der Oligonukleotide besteht darin, das Oligonukleotid als solches unverändert zu belassen und mit einer Gruppe zu versehen, die ihm die aufgestrebten Eigenschaften verleiht, z.B. mit Molekülen, die den Transport in die Zelle erleichtern.

Bedarf an einem effizienten System für das Einführen von Nukleinsäure in lebende Zellen besteht außerdem im Rahmen der Gentherapie. Dabei werden Gene in Zellen eingeschleust, um *in vivo* die Synthese therapeutisch wirksamer Genprodukte zu erzielen, z.B. um im Falle eines genetischen Defekts das fehlende Gen zu ersetzen. Beispiele für weitere Anwendungsmöglichkeiten sind genetisch bedingte Erkrankungen, bei denen die Gentherapie einen erfolgversprechenden Ansatz darstellt, sind Hämophilie, beta-Thalassemie und "Severe Combined Immune Deficiency" (SCID), ein Syndrom, das durch einen genetisch bedingten Mangel des Enzyms Adenosin-deaminase hervorgerufen wird. Die "klassische" Gentherapie beruht auf dem Prinzip, durch eine einmalige Behandlung eine dauernde Heilung zu erzielen. Daneben besteht jedoch Bedarf an Behandlungsmethoden,

bei denen die therapeutisch wirksame DNA (oder auch mRNA) wie ein Medikament ("Gentherapeutikum") je nach Bedarf einmalig oder wiederholt verabreicht wird. Anwendungsmöglichkeiten für dieses Prinzip bestehen bei der Immunregulation, wobei durch Verabreichung funktioneller Nukleinsäure, die für ein sekretiertes Protein-Antigen oder für ein nicht-sekretiertes Protein-Antigen kodiert, mittels einer Impfung eine humorale oder intrazelluläre Immunität erzielt wird. Beispiele für genetische Defekte, bei denen eine Verabreichung von Nukleinsäure, die für das defekte Gen kodiert, in individuell auf den Bedarf abgestimmter Form verabreicht werden kann, sind Muskeldystrophie (Dystrophin-Gen), Cystische Fibrose (Transmembran-Regulations-Gen), Hypercholesterolemie (HDL-Rezeptor-Gen). Gentherapeutische Behandlungsmethoden sind weiters potentiell dann von Bedeutung, wenn Hormone, Wachstumsfaktoren oder cytotoxisch oder immunmodulierend wirkende Proteine im Organismus synthetisiert werden sollen.

Die bisher am weitesten fortgeschrittenen Technologien für die Anwendung von Nukleinsäuren im Rahmen der Gentherapie benutzen retrovirale Systeme für den Transfer von Genen in die Zelle (Wilson et al., 1990, Kasid et al., 1990). Die Verwendung von Retroviren ist jedoch problematisch, weil sie, zumindest zu einem geringen Prozentsatz, die Gefahr von Nebenwirkungen wie Infektion mit dem Virus (durch Rekombination mit endogenen Viren und mögliche anschließende Mutation zur pathogenen Form) oder Entstehung von Krebs in sich birgt. Außerdem ist die stabile Transformation der somatischen Zellen des Patienten, wie sie mit Hilfe von Retroviren erzielt wird, nicht in jedem Fall wünschenswert, weil dadurch die Behandlung, z.B. bei

Auftreten von Nebeneffekten, nur mehr schwierig rückgängig gemacht werden kann.

Es wurde daher nach alternativen Methoden gesucht, um die Expression von nicht-replizierender DNA in der Zelle zu ermöglichen.

Für die Gentransformation von Säugetierzellen *in vitro* sind verschiedene Techniken bekannt, deren Anwendbarkeit *in vivo* jedoch beschränkt ist (dazu zählen das Einbringen von DNA mittels Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran oder die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode).

Neuere Bestrebungen, Methoden für den *in vivo* Gentransfer zu entwickeln, konzentrieren sich auf die Verwendung des kationischen Lipidreagens Lipofektin, von dem gezeigt werden konnte, daß ein mit Hilfe dieses Reagens injiziertes Plasmid im Organismus exprimiert wird (Nabel et al., 1990).

Eine weitere kürzlich entwickelte Methode benutzt Mikropartikel aus Wolfram oder Gold, an denen DNA absorbiert ist, mit denen die Zelle mit hoher Energie beschossen werden (Johnston, 1990, Yang et al., 1990). Expression der DNA konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Ein *in vivo* anwendbares lösliches System, das DNA zielgerichtet in die Zellen befördert, wurde für Hepatozyten entwickelt und beruht auf dem Prinzip, Polylysin an ein Glykoprotein, auf das ein an der Hepatozytenoberfläche vorhandener Rezeptor anspricht, zu koppeln und daraufhin durch Zugabe von DNA einen löslichen Glykoprotein/Polylysin/DNA-Komplex zu bilden,

der in die Zelle aufgenommen wird und nach Aufnahme des Komplexes in die Zelle die Expression der DNA-Sequenz ermöglicht (G.Y. Wu, C.H. Wu, 1987).

Dieses System ist spezifisch für Hepatozyten und wird hinsichtlich seiner Funktion durch den relativ gut charakterisierten Aufnahmemechanismus durch den Asiologlykoproteinrezeptor definiert.

Ein breiter anwendbares, effizientes Transportsystem benutzt den Transferrinrezeptor für die Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zelle mittels Transferrin-Polykation-Konjugaten. Dieses System ist Gegenstand der Europäischen Patentanmeldung A1 388.758. Es konnte gezeigt werden, daß Transferrin-Polykation/DNA-Komplexe effizient in lebende Zellen aufgenommen und internalisiert werden, wobei als Polykationanteil der Komplexe Polylysin verschiedenen Polymerisationsgrades und Protamin verwendet wurden. Mit Hilfe dieses Systems wurde u.a. ein das erbB-Onkogen inhibierendes Ribozymgen in erbB-transformierte Hühnerzellen eingebracht und die erbB inhibierende Wirkung nachgewiesen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein System bereitzustellen, mit Hilfe dessen ein selektiver Transport von Nukleinsäuren in höhere eukaryotische Zellen, insbesondere Zellen der T-Zell-Abstammungslinie ("T-cell lineage") ermöglicht wird. (Im folgenden werden Zellen der T-Zell-Abstammungslinie der Einfachheit halber als T-Zellen bezeichnet. Darunter sind Vorläufer-T-Zellen sowie die daraus diversifizierenden Linien einschließlich der reifen T-Zellen zu verstehen).

T-Lymphozyten (T-Zellen) differenzieren im Thymus. Eine ihrer Aufgaben ist die Unterstützung der B-Zellen bei der Antigenantwort. Eines der Charakteristika von T-Zellen ist, daß sie kein freies Antigen erkennen, sondern Fragmente von Antigenen. T-Zellen erkennen ein solches Peptid-Antigen-Fragment auf der Oberfläche von Zielzellen durch einen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR), der mit einem an ein MHC (major histocompatibility complex)-Molekül gebundenen Antigen in Wechselwirkung tritt. Die spezifische Antigenerkennung erfordert die Mitwirkung eines weiteren Rezeptors, CD4 oder CD8, mit nicht-polymorphen Regionen von MHC. Dieses Zusammenwirken von TCR und entweder CD4 oder CD8 mit einem MHC-Molekül auf Zielzellen ist für die Ausbildung der spezifischen Fähigkeiten von T-Zellen während der thymischen Entwicklung erforderlich und erlaubt die antigenspezifische Aktivierung reifer T-Zellen. T-Zellen, die mit Klasse I MHC Molekülen assoziiertes Antigen erkennen (vorwiegend Killerzellen), exprimieren CD8; Zellen, die Klasse II-assozierte Antigene erkennen (vorwiegend Helferzellen), exprimieren CD4. Aufgaben von CD4<sup>+</sup>-Zellen im Rahmen der Immunantwort sind neben der Induktion der B-Zellfunktion die Aktivierung von Makrophagen, die Sekretion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für lymphoide Zellen, die Sekretion von Faktoren, die nicht-lymphoide Zellfunktionen induzieren, die Induktion der Suppressor-, der NK- und der cytotoxischen T-Zellfunktion (Fauci, 1988).

Neben seiner wichtigen Rolle bei der Immunerkennung spielt CD4, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55.000, das außer auf T-Zellen auch in geringerem Ausmaß auf Monozyten/Makrophagen vorhanden ist, eine entscheidende Rolle bei der Infektion mit dem HIV-Virus, indem es als Rezeptor für das Virus fungiert.

HIV ist der Erreger von AIDS ("acquired immunodeficiency syndrome"), einer schweren Erkrankung, die mit einer progressiven und irreversiblen Schädigung des Immunsystems einhergeht. Diese wird vor allem durch eine selektive Verringerung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hervorgerufen.

Seit seiner Entdeckung wurde das HIV-Virus eingehend hinsichtlich seiner molekularen Biologie, seiner Infektiosität und der Mechanismen der Pathogenese untersucht.

HIV ist ein RNA-Retrovirus, das ursprünglich HTLV-III, LAV oder ARV bezeichnet wurde. Das früher als HIV bezeichnete Virus wird derzeit häufig auch als HIV-1 bezeichnet, um es von einem in westafrikanischen Patienten nachgewiesenen Virus (HIV-2) zu unterscheiden, das Verwandtschaft zum SIV-Virus aufweist und ein von AIDS nicht unterscheidbares Krankheitsbild verursacht.

Das HIV-Virusgenom ist gut charakterisiert. Es weist eine Länge von ca. 10 kb auf und umfaßt die flankierenden LTR ("long terminal repeat") Sequenzen, die regulatorische Sequenzen für die Replikation enthalten, sowie mindestens neun Gene. Diese Gene umfassen nicht nur die allen replikationsfähigen Viren gemeinsamen gag, pol und env-Gene, sondern auch Gene, die an der Reifung und Morphogenese beteiligt sind (vpu und vif), Gene, beteiligt an der Regulation der Virusreplikation (tat, rev und nef) und ein Gen unbekannter Funktion (vpr). Das tat-Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der Virusreplikation, indem es für ein Protein mit trans-Aktivatorfunktion für die HIV-Genexpression kodiert.

Nach seiner Bindung an das CD4-Molekül, das für HIV ein Rezeptor mit hoher Affinität ist (Dalgleish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; McDougal et al., 1986), wird das Virus in die Zelle aufgenommen und von seiner Hülle befreit. Zum Ablauf dieses Vorganges existieren widersprüchliche Ansichten. Es wurde u.a. vorgeschlagen, daß bei diesem Vorgang Rezeptor-vermittelte Endozytose eine Rolle spielt (Maddon et al., 1986; Pauza und Price, 1988). Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, daß für den Eintritt des Virus in die Zelle die Fusion des transmembranen Teils (gp41) der Virushülle mit der Zellmembran unabhängig vom pH-Wert erforderlich ist (Stein et al., 1987). Weiters wurde beobachtet, daß humanes CD4 exprimierende Mauszellen trotz Bindung des Virus an die Zelle nicht produktiv infiziert werden können. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß außer CD4 gegebenenfalls noch andere Proteine auf humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen für die Internalisierung des Virus mitverantwortlich sind.

Die Bindung des HIV-Virus an das CD4-Molekül erfolgt über das Virus-Hüllprotein (env).

Das Primärprodukt des env-Gens, gp160, ist ein Precursor, dessen Spaltung (während der Reifung auf dem Weg durch das ER und den Golgi-Apparat) die Virionproteine gp120 und gp41 ergibt. Die Spaltung von gp160 ist für die Fusion des Virus mit der Zelle und für die Infektiosität erforderlich. gp120 ist das äußere Hüll-Glycoprotein und auf der Außenseite der Membran infizierter Zellen und von Viruspartikeln vorhanden. Es weist keine Membran-Verankerungsdomäne auf und bleibt mit der Membran ausschließlich durch nichtkovalente Bindung mit gp41 verbunden. gp120 enthält die für die Bindung des Virus an den

Rezeptor wesentliche Determinante. Die hochaffine Bindung zwischen dem Virus und der Zellmembran wird durch Wechselwirkung zwischen einem Abschnitt von 40 Aminosäuren am C-Terminus von gp120 und einer Domäne nahe dem N-Terminus von CD4 vermittelt. Wenn auch zwischen den verschiedenen HIV-Stämmen erhebliche Unterschiede in den gp120 Sequenzen bestehen, sind die CD4-Bindungsdomänen zwischen HIV-1, HIV-2 und den verwandten SIV-Viren konserviert. Es wurden proteolytische Fragmente von 95 und 25 kDa isoliert, die offensichtlich domänenartige Unterteilungen von gp120 darstellen und an CD4 in gleicher Weise zu binden vermögen wie das ursprüngliche gp120 (Nygren et al., 1988).

Über den Ablauf des Fusionsvorganges gibt es verschiedene Theorien; unbestritten ist jedoch die Schlüsselrolle von gp41 für diesen Vorgang. gp41 weist eine hydrophobe Sequenz mit starker Homologie zu Fusionssequenzen am N-Terminus von Transmembran-Proteinen anderer Viren auf. Es wurde beobachtet, daß die env-Proteine ein Oligomeres bilden, wobei möglicherweise ein allosterisches Rearrangement des Oligomeren auf der Virusmembran das Einbringen des gp41-N-Terminus in die Ziel-Zellmembran und die Fusion fördert (derselbe Effekt wird für die Syncitienbildung zwischen infizierten Zellen verantwortlich gemacht).

Einer der als aussichtsreich angesehenen Ansätze, die HIV-Infektion zu blockieren, ist die Neutralisierung durch eine lösliche, sekretierte Form des CD4-Antigens (Smith et al.; 1987), die um die Bindung an gp120 konkurriert.

Eine therapeutische Möglichkeit, nach bereits erfolgter HIV-Infektion des Organismus die noch nicht infizierten

Zellen zu schützen bzw. die Aktivierung des latenten Virus in den befallenden Zellen zu verhindern, besteht in der Verabreichung von die Virusreplikation inhibierenden Nukleinsäuremolekülen.

Für derartige therapeutische Anwendungen von Nukleinsäuren ist deren effiziente Aufnahme in die Zelle erforderlich.

Es wurde überraschend festgestellt, daß Proteine, die an ein Zelloberflächenprotein binden, das von T-Zellen exprimiert wird, für den Transport von Nukleinsäuren in Zellen, die das Zelloberflächenprotein exprimieren, herangezogen werden können, wenn sie mit Polykationen konjugiert werden.

Es wurde festgestellt, daß der vom HIV-Virus bei der Infektion benutzte Rezeptor, CD4, für den Transport von Nukleinsäure in die Zelle ausgenutzt werden kann, indem die zu importierende Nukleinsäure mit einem Protein-Polykation-Konjugat komplexiert wird, dessen Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit ist, an CD4 zu binden, und CD4 exprimierende Zellen mit den erhaltenen Protein-Polykation/DNA-Komplexen in Berührung gebracht werden.

Weiters konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe von Antikörper-Polykation-Konjugaten, enthaltend einen Antikörper gegen CD7, DNA in Zellen der T-Zell-Abstammungslinie ("T-cell lineage") eingeführt und in diesen Zellen exprimiert wird. (CD7 ist ein Zelloberflächenprotein mit derzeit noch unbekannter physiologischer Rolle, das auf Thymozyten und reifen T-Zellen nachgewiesen wurde. CD7 ist ein verlässlicher Marker für die akute T-Zellenleukämie (Aruffo und Seed, 1987).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte somit anhand von Protein-Polykation-Konjugaten mit verschiedenen Proteinen, denen die Fähigkeit gemeinsam ist, an T-Zelloberflächenproteine zu binden, nachgewiesen werden, daß mit Hilfe solcher Konjugate in Zellen, die das jeweilige T-Zell-Oberflächenantigen exprimieren, Internalisierung und Expression von DNA erzielt werden kann.

Die Erfindung betrifft somit neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanalogen Komplexe zu bilden, wobei der Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit ist, an ein Zelloberflächenprotein, das von T-Zellen exprimiert wird, zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in Zellen, das Zelloberflächenprotein exprimieren, insbesondere T-Zellen, aufgenommen werden.

Im folgenden werden Proteine bzw. Fragmente davon mit der Fähigkeit, an Zelloberflächenproteine von T-Zellen zu binden, als T-Zell-bindende Proteine (TZBPs) bezeichnet.

Vertreter von Proteinen mit der Fähigkeit zur Bindung an CD4 (bzw. CD7) werden als "CD4 (CD7) bindendes Protein" oder "CD4BP (CD7BP)" bezeichnet.

Gegenstand der Erfindung sind weiters TZBP-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe, in denen die erfindungsgemäßen Konjugate mit einer in die Zielzellen, die das T-Zelloberflächenantigen exprimieren, an das das TZBP bindet, zu transportierenden Nukleinsäure komplexiert ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß DNA in Form der erfindungsgemäßen Komplexe effizient in Zellen, die das jeweilige T-Zelloberflächenantigen exprimieren, an das das TZBP bindet, aufgenommen und exprimiert wird, wobei die Aufnahme von DNA in die Zelle mit steigendem Konjugatgehalt zunahm.

Im Falle der Verwendung von Antikörpern als TZBPs kommen alle diejenigen, insbesondere monoklonalen Antikörper gegen T-Zelloberflächenprotein bzw. Fragmente davon in Betracht, die an das jeweilige Zelloberflächenprotein binden, z.B. Fab'-Fragmente (Pelchen-Matthews et al., 1989).

Dazu zählen monoklonale Anti-CD4-Antikörper, die ein gp120-Epitop aufweisen, das mit dem Virus um die Bindung an dieses Epitop zu konkurriert.

Anstelle konventioneller monoklonaler Antikörper bzw. deren Fragmente können Antikörperabschnitte, bestehend aus einer Kombination von Segmenten der schweren und leichten Kette oder gegebenenfalls der schweren Kette allein, verwendet werden. Die Herstellung solcher "alternativer" Antikörper durch Klonierung mittels Polymerase-Kettenreaktion und Expression in E.coli wurde kürzlich beschrieben (Sastry et al., 1989; Orlandi et al., 1989; Chaudhary et al., 1990).

Als CD4BPs kommen weiters HIV-1-gp120 bzw. homologe Proteine verwandter Retroviren bzw. Fragmente davon in Betracht. Zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete gp120-Fragmente sind diejenigen, die zur Bindung an CD4 befähigt sind (Lasky et al., 1987), z.B die 95-kDa und 25-kDa-Fragmente, von denen nachgewiesen wurde, daß sie an CD4 binden

(Nygren et al.; 1988). Solche Fragmente können z.B erhalten werden, indem entweder zunächst das gesamte gp120 Protein auf rekombinantem Weg hergestellt und anschließend proteolytisch gespalten wird. Eine alternative Methode besteht in der rekombinanten Herstellung der Fragmente selbst.

Die Wahl des TZBP wird vor allem durch die Zielzellen bestimmt, z.B. durch bestimmte Oberflächenantigene oder Rezeptoren, die für einen Zelltyp spezifisch bzw. weitgehend spezifisch sind und somit einen gerichteten Import der Nukleinsäure in diesen Zelltyp ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Konjugate ermöglichen je nach Oberflächenantigen, an das das im Konjugat enthaltene Protein bindet, eine engere oder breitere Selektivität hinsichtlich der mit Nukleinsäure zu behandelnden, das T-Zelloberflächenprotein exprimierenden Zellen und somit einen flexiblen Einsatz therapeutisch oder gentherapeutisch wirksamer Nukleinsäure.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als Konjugat-Komponente TZBPs geeignet, die an die Zelle binden, wodurch die Konjugat/DNA-Komplexe, insbesondere über Endozytose, internalisiert werden, oder TZBPs, deren Bindung/Internalisierung über Fusion mit Zellmembranelementen erfolgt.

Wesentlich für die Eignung von TZBPs im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist,

- a) daß sie vom spezifischen Zelltyp, in den die Nukleinsäure eingebracht werden soll, erkannt werden und ihre Bindungsfähigkeit nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigt wird, wenn sie mit dem Polykation konjugiert werden, und

- b) daß sie im Rahmen dieser Eigenschaft in der Lage sind, Nukleinsäure auf dem von ihnen benutzten Weg in die Zelle "huckepack" mitzunehmen.

Unter der Voraussetzung, daß sie die unter a) und b) definierten Bedingungen erfüllen, sind grundsätzlich alle an T-Zelloberflächenantigene/Rezeptoren bindenden Proteine für die Anwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet. Dazu zählen Antikörper gegen T-Zelloberflächenproteine, die spezifisch auf einem oder mehreren Vertretern von Zellen eines bestimmten Differenzierungszustandes exprimiert werden, z.B. Antikörper gegen CD4, CD44, CD7, CD3, CD8 bzw. die entsprechenden Antikörperfragmente.

Für die gezielte Anwendung auf Tumorzellen kommen vor allem Antikörper gegen spezifisch auf T-Zellen exprimierte Zelloberflächenproteine, sog. Tumormarker, in Betracht, z.B. CD7.

Neben Antikörpern und gpl20(Fragmenten) sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle natürliche Antigene, die die unter a) und b) angeführten Bedingungen erfüllen, geeignet.

Zu im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Polykationen zählen homologe Polykationen wie Polylysin, Polyarginin, Polyornithin oder heterologe Polykationen mit zwei oder mehr unterschiedlichen positiv geladenen Aminosäuren zu verstehen, wobei diese Polykationen verschiedene Kettenlänge aufweisen können, weiters nichtpeptidische synthetische Polykationen wie Polyethylenimin. Geeignete sind weiters natürliche

DNA bindende Proteine polykationischen Charakters wie Histone oder Protamine bzw. Analoge oder Fragmente davon.

Als Polykationen bzw. (poly)Peptide polykationischen Charakters können folgende Verbindungen verwendet werden:

- a) Protamine: Dabei handelt es sich um kleine (MG bis ca. 8000), stark basische Proteine, deren positiv geladene Aminosäurereste (vor allem Arginine) für gewöhnlich in Gruppen angeordnet sind und die auf Grund ihres polykationischen Charakters die negativen Ladungen von Nukleinsäuren neutralisieren (Warrant et al., 1978). Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendbaren Protamine können natürlichen Ursprungs oder auf rekombinantem Weg hergestellt sein, wobei Mehrfachkopien hergestellt bzw. Modifikationen hinsichtlich Molekülgröße und Aminosäuresequenz vorgenommen werden können. Entsprechende Verbindungen können auch chemisch synthetisiert werden. Bei der Synthese eines künstlichen Protamins kann z.B. so vorgegangen werden, daß Aminosäurereste, die beim natürlichen Protamin Funktionen haben, die für die Transportfunktion unerwünscht sind (z.B. Kondensation von DNA) durch geeignete andere Aminosäuren ersetzt werden und/oder an einem Ende eine Aminosäure (z.B. Cystein) vorgesehen wird, die die gezielte Konjugation mit CD4BP ermöglicht.
- b) Histone: Dies sind im Chromatin vorhandene kleine DNA-bindende Proteine mit einem hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin), der sie befähigt, unabhängig von der

Nukleotidsequenz an DNA zu binden und sie in Nukleosome zu falten, wozu besonders die argininreichen Histone H3 und H4 geeignet sind (Felsenfeld, 1978). Bezuglich der Herstellung und der Modifikationen gilt grundsätzlich das für Protamine Gesagte.

- c) **Synthetische Polypeptide, wie homologe Polypeptide (Polylysin, Polyarginin) oder heterologe Polypeptide (bestehend aus zwei oder mehr Vertretern positiv geladener Aminosäuren).**
- d) **Nichtpeptische Kationen wie Polyethylenimine.**

Die Größe der Polykationen wird bevorzugt so gewählt, daß die Summe der positiven Ladungen etwa 20 bis 500 beträgt, sie wird auf die zu transportierende Nukleinsäure abgestimmt.

Die erfindungsgemäßen TZBP-Polykation-Konjugate können auf chemischem Weg in für die Kopplung von Peptiden an sich bekannter Weise hergestellt werden, wobei, falls erforderlich, die Einzelkomponenten vor der Kopplungsreaktion mit Linkersubstanzen versehen werden (diese Maßnahme ist dann erforderlich, wenn von vornherein keine für die Kopplung geeignete funktionelle Gruppe, z.B. eine Mercapto- oder Alkoholgruppe, verfügbar ist. Bei den Linkersubstanzen handelt es sich um bifunktionelle Verbindungen, die zunächst mit funktionellen Gruppen der Einzelkomponenten zur Reaktion gebracht werden, worauf die Kopplung der modifizierten Einzelkomponenten durchgeführt wird.

Je nach gewünschten Eigenschaften der Konjugate, insbesondere im Hinblick auf deren Stabilität, kann die Kopplung erfolgen über

- a) Disulfidbrücken, die unter reduzierenden Bedingungen wieder gespalten werden können (z.B. bei Verwendung von Succinimidylpyridyldithiopropionat (Jung et al., 1981)).
- b) Unter biologischen Bedingungen weitgehend stabile Verbindungen (z.B. Thioether durch Reaktion von Maleimido-Linkern mit Sulfhydrylgruppen des an die zweite Komponente gebundenen Linkers).
- c) Unter biologischen Bedingungen labile Brücken, z.B. Esterbindungen, oder unter schwach sauren Bedingungen instabile Acetal- oder Ketalbindungen.

Es ist auch möglich, die erfindungsgemäßen Konjugate auf rekombinantem Weg herzustellen, was den Vorteil hat, genau definierte, einheitliche Verbindungen erhalten zu können, während bei der chemischen Kopplung Konjugat-Gemische entstehen, die aufgetrennt werden müssen.

Die rekombinante Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate ist nach für die Herstellung von chimären Polypeptiden bekannten Methoden durchführbar. Dabei können die polykationischen Peptide hinsichtlich ihrer Größe und Aminosäuresequenz variiert werden. Die gentechnologische Herstellung bietet auch den Vorteil, den TZBP-Anteil des Konjugats modifizieren zu können, indem z.B. durch geeignete Mutationen die Bindungsfähigkeit an das Zelloberflächenprotein gesteigert werden kann oder ein TZBP-Anteil, verkürzt auf den für die Bindung an das Zelloberflächenprotein

maßgeblichen Teil des Moleküls, verwendet wird (z.B Verwendung von gp120-Fragmenten oder "alternativer" Antikörper). Besonders zweckmäßig für die rekombinante Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate ist die Verwendung eines Vektors, der die für den TZBP-Anteil kodierende Sequenz sowie einen Polylinker enthält, in den die jeweils benötigte für das polykationische Peptid kodierende Sequenz eingesetzt wird. Auf diese Weise kann ein Satz von Expressionsplasmiden erhalten werden, von dem bei Bedarf das die gewünschte Sequenz enthaltende Plasmid zur Expression des erfindungsgemäßen Konjugats herangezogen wird.

Das molare Verhältnis Antikörper:Polykation beträgt bevorzugt 10:1 bis 1:10, wobei zu berücksichtigen ist, daß es zur Ausbildung von Aggregaten kommen kann. Dieses Verhältnis kann jedoch bei Bedarf innerhalb weiterer Grenzen liegen, solange die Bedingung erfüllt ist, daß Komplexierung der Nukleinsäure(n) stattfindet und gewährleistet ist, daß der gebildete Komplex an das Zelloberflächenprotein gebunden und in die Zelle befördert wird. Dies kann durch einfach durchzuführende Versuche von Fall zu Fall überprüft werden, z.B indem Zelllinien, die das T-Zelloberflächenantigen exprimieren, mit den erfindungsgemäßen Konjugaten in Berührung gebracht werden und daraufhin auf das Vorhandensein von Nukleinsäure in der Zelle untersucht werden, z.B. durch Southern Blot Analyse, Hybridisierung mit radioaktiv markierten komplementären Nukleinsäuremolekülen, durch Amplifikation mit Hilfe der PCR oder durch Nachweis des Genproduktes eines Reportergens.

Für bestimmte Anwendungsfälle bei Verwendung von Antikörpern als TZBPs, vor allem für das Screening zum

Auffinden geeigneter Antikörper, kann es vorteilhaft sein, den Antikörper nicht direkt an das Polykation zu koppeln: für eine effiziente chemische Kopplung ist im allgemeinen eine größere Menge (mehr als 1 mg) Ausgangsantikörper erforderlich, außerdem wird durch die Kopplung gegebenenfalls die Antikörper-Bindungsdomäne inaktiviert. Um dieses Probleme zu umgehen und ein rasches Screening geeigneter Antikörper zu ermöglichen, kann zunächst ein Protein A- Polykation-Konjugat hergestellt werden, an das anschließend, gegebenenfalls in bereits mit Nukleinsäure komplexierter Form, unmittelbar vor der Transfektion der Zellen, der Antikörper über die Fc-Bindungsdomäne von Protein A gebunden wird (Surolia et al., 1982). Die mit den Protein A-Konjugaten gebildeten Nukleinsäure-Komplexe ermöglichen ein rasches Testen von Antikörpern auf ihre Eignung für den Import von Nukleinsäure in den jeweiligen zu behandelnden Zelltyp. Die Kopplung von Protein A mit dem jeweiligen Polykation erfolgt in analoger Weise wie die direkte Kopplung mit dem Antikörper. Bei der Anwendung von Protein-A-Antikörper-Polykation-Konjugaten kann es vorteilhaft sein, die zu behandelnden Zellen zuerst mit dem Antikörper zu inkubieren, die Zellen von überschüssigem Antikörper zu befreien und anschließend mit dem Protein A-Polykation/Nukleinsäure-Komplex zu behandeln. Die Herstellung von Protein A-Konjugaten kann je nach verwendetem Polykation auf rekombinantem Weg erfolgen.

Bei den in die Zelle zu transportierenden Nukleinsäuren kann es sich um DNAs oder RNAs handeln, wobei hinsichtlich der Nukleotidsequenz keine Beschränkungen bestehen. Die Nukleinsäuren können modifiziert sein, sofern die Modifikation den polyanionischen Charakter

der Nukleinsäuren nicht beeinträchtigt; zu diesen Modifikationen zählen z.B. die Substitution der Phosphodiestergruppe durch Phosphorothioate oder in der Verwendung von Nukleosidanalogen. Derartige Modifikationen sind dem Fachmann geläufig, eine Übersicht über Vertreter modifizierter Nukleinsäuren, die im allgemeinen als Nukleinsäureanaloga bezeichnet werden, sowie deren Wirkprinzip, sind in der Übersicht von Zon (1988) angegeben.

Bezüglich der Größe der Nukleinsäuren ermöglicht die Erfindung ebenfalls Anwendungen in einem weiten Bereich. Hinsichtlich der oberen Grenze besteht keine durch die erfindungsgemäßen Konjugate bedingte prinzipielle Limitierung, solange gewährleitet ist, daß die TZBP-Polykation/Nukleinsäurekomplexe in die Zelle befördert werden. Eine etwaige Begrenzung nach unten ergibt sich aus anwendungsspezifischen Gründen, weil z.B. Antisense-Oligonukleotide unter etwa 10 Nukleotiden auf Grund zu geringer Spezifität kaum für die Anwendung in Frage kommen. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate können auch Plasmide in die Zelle befördert werden.

Es ist auch möglich, gleichzeitig verschiedene Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate in die Zelle zu befördern.

Beispiele für geeignete Nukleinsäuren sind die bereits angeführten Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme mit Komplementarität zu für die Virusreplikation essentiellen Genabschnitten.

Bevorzugt als Nukleinsäureanteil der erfindungsgemäßen TZBP-Polykation-Nukleinsäurekomplexe mit inhibierender Wirkung aufgrund von Komplementarität ist

Antisense-DNA, Antisense-RNA oder ein Ribozym bzw. das dafür kodierende Gen. Bei der Anwendung von Ribozymen und Antisense-RNAs ist es besonders vorteilhaft, die dafür kodierenden Gene, gegebenenfalls zusammen mit einem Carrierogen, einzusetzen. Durch die Einführung des Gens in die Zelle wird gegenüber dem Import der RNA als solcher eine beträchtliche Amplifikation der RNA und damit ein für die angestrebte Hemmung der biologischen Reaktion ausreichender Vorrat gewährleistet. Besonders geeignete Carrierogene sind die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten, z.B. tRNA-Gene. In diese können z.B. Ribozymgene derart eingefügt werden, daß bei Transkription das Ribozym Teil eines kompakten Polymerase III-Transkripts ist. Geeignete genetische Einheiten, enthaltend ein Ribozymgen und ein von Polymerase III transkribiertes Carrierogen, sind in der Europäischen Patentanmeldung A1 0 387 775 geoffenbart. Mit Hilfe des Transportsystems gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Wirkung dieser genetischen Einheiten verstärkt werden, indem eine erhöhte Ausgangskonzentration des Gens in der Zelle gewährleistet wird.

Als Zielsequenzen für die Konstruktion komplementärer Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme bzw. der dafür kodierenden Gene, die bei der Therapie von AIDS zur Anwendung kommen können, sind grundsätzlich sämtliche Sequenzen des HIV-Gens geeignet, deren Blockierung die Inhibierung der viralen Replikation und Expression zur Folge hat. In erster Linie in Frage kommende Zielsequenzen sind Sequenzen mit regulatorischer Funktion, vor allem des tat-, rev- oder nef-Gens. Geeignete Sequenzen sind weiters die Initiations-, Polyadenylierungs-, Splicing tRNA Primer-Bindungsstelle (PBS) der LTR-Sequenz oder die tar-Sequenz.

Außer Nukleinsäuremolekülen, die aufgrund ihrer Komplementarität zu viralen Genen inhibieren, können auch Gene mit anderem Wirkmechanismus eingesetzt werden, z.B. solche, die für Virusproteine, enthaltend sog. trans-dominante Mutationen, kodieren (Herskowitz, 1987). Die Expression der Genprodukte in der Zelle resultiert in Proteinen, die in ihrer Funktion das entsprechenden Wildtyp-Virusprotein dominieren, womit dieses seine für die Virusreplikation normalerweise geleistete Aufgabe nicht erfüllen kann und die Virusreplikation wirksam inhibiert wird. Geeignet sind grundsätzlich trans-dominante Mutanten von Virusproteinen, die für die Replikation und Expression erforderlich sind, z.B. Gag-, Tat- und Rev-Mutanten, von denen inhibierende Wirkung auf die HIV-Replikation nachgewiesen wurde (Trono et al., 1989; Green et al., 1989; Malim et al., 1989).

Vertreter therapeutisch wirksamer Nukleinsäuren sind weiters solche mit inhibierender Wirkung auf Onkogene.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung können auch Gene bzw. Abschnitte davon in die Zelle transportiert werden, deren Expressionsprodukte eine Funktion bei der Signalübertragung haben, um auf diese Weise die Signalübertragung in den Zielzellen positiv zu beeinflussen und damit z.B. die Überlebensfähigkeit von T-Zellen zu steigern.

Prinzipiell sind sämtliche Gene bzw. Genabschnitte im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet, die in den das T-Zelloberflächenprotein exprimierenden Zellen einen therapeutischen oder gentherapeutischen Effekt haben.

Das Verhältnis Nukleinsäure: Konjugat kann innerhalb eines weiten Bereichs schwanken, wobei es nicht unbedingt erforderlich sein muß, sämtliche Ladungen der Nukleinsäure zu neutralisieren. Dieses Verhältnis wird von Fall zu Fall nach Kriterien wie Größe und Struktur der zu transportierenden Nukleinsäure, Größe des Polykations, Anzahl und Verteilung seiner Ladungen, derart einzustellen sein, daß ein für die jeweilige Anwendung günstiges Verhältnis zwischen Transportfähigkeit und biologischer Aktivität der Nukleinsäure besteht. Dieses Verhältnis kann zunächst grob eingestellt werden, etwa an Hand der Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der DNA in einem Gel (z.B. mittels "Mobility Shift" auf einem Agarosegel) oder durch Dichtegradientenzentrifugation. Nach Erhalt dieses vorläufigen Verhältnisses kann es zweckmäßig sein, im Hinblick auf die in der Zelle maximal verfügbare Aktivität der Nukleinsäure Transportversuche mit dem radioaktiv markierten Komplex durchzuführen und den Konjugat-Anteil gegebenenfalls derart zu reduzieren, daß die verbleibenden negativen Ladungen der Nukleinsäure dem Transport in die Zelle nicht hinderlich sind.

Die Herstellung der TZBP-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe kann nach in an sich für die Komplexierung polyionischer Verbindungen bekannten Methoden vorgenommen werden. Eine Möglichkeit, unkontrollierte Aggregation bzw. Ausfällung zu vermeiden, besteht darin, die beiden Komponenten bei hoher Verdünnung ( $\leq 100 \mu\text{g}$ ) zu mischen.

Die über Endozytose in höhere eukaryotische Zellen aufnehmbaren TZBP-Polykation-Nukleinsäure-Komplexe können zusätzlich eine oder mehrere Polykationen in nicht-kovalent gebundener Form, die gegebenenfalls

identisch sind mit dem Polykation im Konjugat, derart enthalten, daß die durch das Konjugat erzielte Internalisierung und/oder Expression der Nukleinsäure gesteigert wird.

Mit Hilfe derartiger Maßnahmen, die Gegenstand der unveröffentlichten Deutschen Patentanmeldung Nr. 41 04 186.0 sind, wird bei zumindest gleicher Transfektions/Expressions-Effizienz eine geringere Menge, bezogen auf die in die Zelle zu importierende Nukleinsäure-Menge, TZBP-Polykation-Konjugat benötigt, was einerseits einen geringeren Synthese-Aufwand bedeutet. Eine geringere Konjugatmenge kann andererseits dann von Vorteil sein, wenn der Effekt vermieden werden soll, daß durch eine größere Anzahl von TZBP-Molekülen innerhalb eines Komplexes gleich mehrere benachbarte "Andock-Stellen" besetzt werden und in der Folge für weitere Komplexe nicht mehr verfügbar sein können. Die Anzahl der in den Komplexen enthaltenen Menge an TZBP auf das erforderliche Minimum zu beschränken, d.h. die Konjugatmenge möglichst gering zu halten und mit freiem Polykation zu verdünnen, ist insbesondere auch dann von Vorteil, wenn die Zahl von Zelloberflächenproteinen auf den zu behandelnden Zielzellen gering ist.

Mit Hilfe solcher Maßnahmen kann die Leistungsfähigkeit von Konjugaten, die für sich weniger effizient sind, beträchtlich erhöht werden und die Leistungsfähigkeit von an sich schon sehr effizienten Konjugaten noch weiter gesteigert werden.

Hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung der erfindungsgemäßen Komplexe werden im allgemeinen zunächst die in die Zelle zu importierende Nukleinsäure und das TZBP festgelegt. Die Nukleinsäure wird vor

allem durch den in der Zelle zu erzielenden biologischen Effekt definiert, z.B. durch die Zielsequenz des zu inhibierenden oder - im Falle der Anwendung im Rahmen der Gentherapie - des zur Expression zu bringenden Gens bzw. Genabschnitts, z.B. zwecks Substitution eines defekten Gens. Gegebenenfalls ist die Nukleinsäure modifiziert, bedingt z.B. durch eine für den jeweiligen Anwendungsfall erforderliche Stabilität.

Ausgehend von der Festlegung von Nukleinsäure und TZBP wird das Polykation auf diese Parameter abgestimmt, wobei die Größe der Nukleinsäure, vor allem im Hinblick auf eine weitgehende Neutralisierung der negativen Ladungen, eine wesentliche Rolle spielt.

Für die Wahl der gegebenenfalls in den Komplexen enthaltenen nicht-kovalent gebundenen Polykationen ist entscheidend, daß durch ihren Zusatz gegenüber der durch die Konjugate erzielbaren Internalisierung/Expression der Nukleinsäure eine Steigerung bewirkt wird.

Ebenso wie die qualitative Zusammensetzung richtet sich auch die quantitative Zusammensetzung der Komplexe nach mehreren Kriterien, die miteinander in funktionellem Zusammenhang stehen, z.B. ob und in welchem Ausmaß es erforderlich oder erwünscht ist, die Nukleinsäure zu kondensieren, welche Ladung der Gesamtkomplex aufweisen soll, in welchem Ausmaß Bindungs- und Internalisierungsfähigkeit für den jeweiligen Zelltyp gegeben ist und in welchem Ausmaß deren Steigerung erwünscht bzw. erforderlich ist. Weitere Parameter für die Zusammensetzung des Komplexes sind die Zugänglichkeit des TZBPs für das Zelloberflächenprotein, wobei dafür die Art maßgeblich

ist, wie dieses Protein innerhalb des Komplexes der Zelle gegenüber präsentiert wird. Wesentlich ist weiters die Zugänglichkeit der Nukleinsäure in der Zelle, um deren bestimmungsgemäße Funktion auszuüben.

Die in nicht kovalent-gebundener Form in den Komplexen gegebenenfalls enthaltenen Polykationen können gleich oder verschieden sein von den im Konjugat enthaltenen. Ein wesentliches Kriterium für deren Auswahl ist die Größe der Nukleinsäure, insbesondere im Hinblick auf deren Kondensierung; bei kleineren Nukleinsäure-Molekülen ist im allgemeinen eine Kompaktierung nicht erforderlich. Die Auswahl der Polykationen nach Art und Menge wird außerdem auf das Konjugat abgestimmt, wobei vor allem das im Konjugat enthaltene Polykation zu berücksichtigen ist: ist das Polykation z.B eine Substanz, die keine oder nur geringe Fähigkeit zur DNA-Kondensation aufweist, ist es im Hinblick auf eine effiziente Internalisierung der Komplexe im allgemeinen zweckmäßig, solche Polykationen einzusetzen, die diese Eigenschaft in stärker ausgeprägtem Maß besitzen. Ist der das im Konjugat enthaltene Polykation selbst eine Nukleinsäure kondensierende Substanz und wird bereits eine im Hinblick auf effiziente Internalisierung ausreichende Kompaktierung der Nukleinsäure bewirkt, wird zweckmässigerweise ein Polykation verwendet, das aufgrund anderer Mechanismen eine Steigerung der Expression bewirkt.

Wesentlich für das gegebenenfalls im Komplex zusätzlich enthaltene nicht-kovalent gebundene Polykation ist seine Fähigkeit, Nukleinsäure zu kondensieren und/oder diese vor unerwünschtem Abbau in der Zelle zu schützen.

Gegenstand der Erfindung ist weiters ein Verfahren zum Einführen von Nukleinsäure(n) in menschliche oder

tierische Zellen, wobei bevorzugt ein unter physiologischen Bedingungen löslicher Antikörper-Polykation/Nukleinsäure-Komplex mit den Zellen in Berührung gebracht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde als DNA-Komponente das Luciferase-Gen als Reporter-Gen verwendet. (Aufgrund von in Vorversuchen erhaltenen Ergebnissen mit Transferrin-Polykation/DNA-Komplexen, in denen das Luciferase-Gen als Reporter-Gen verwendet wurde, war gezeigt worden, daß aus der Effizienz des Imports des Luciferase-Gens auf die Anwendbarkeit anderer Nukleinsäuren geschlossen werden kann und die verwendete Nukleinsäure in qualitativer Hinsicht kein limitierender Faktor für die Anwendung von Protein-Polykation-DNA-Komplexen ist.

Es kann für bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung vorteilhaft sein, Bedingungen zu schaffen, unter denen der Abbau der in die Zelle importierten Nukleinsäure verringert oder ausgeschaltet wird.

Bedingungen, unter denen der Abbau von Nukleinsäuren inhibiert wird, können durch Zusatz sog. lysosomatroper Substanzen geschaffen werden. Von diesen Substanzen ist bekannt, daß sie die Aktivität von Proteasen und Nukleasen in Lysosomen hemmen und somit den Abbau von Nukleinsäuren verhindern können (Luthmann u. Magnusson, 1983).

Zu diesen Substanzen zählen Chloroquin, Monensin, Nigericin, Ammoniumchlorid und Methylamin.

Das Erfordernis für die Anwendung einer Substanz aus der Gruppe der lysosomatropen Substanzen im Rahmen der

vorliegenden Erfindung richtet sich u.a. nach dem zu behandelnden Zelltyp oder bei Verwendung unterschiedlicher Antikörper gegebenenfalls nach unterschiedlichen Mechanismen, über die die Aufnahme der Komplexe in die Zelle erfolgt. So wurde z.B. im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine unterschiedliche Beeinflussung des DNA-Imports in die Zelle durch Chloroquin bei Verwendung unterschiedlicher Antikörper (monoklonale Anti-CD4-Antikörper) festgestellt.

Es ist in jedem Fall notwendig, das Erfordernis bzw. die Eignung derartiger Substanzen im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Vorversuchen zu testen.

Gegenstand der Erfindung sind weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend als wirksame Komponente eine oder mehrere therapeutisch oder gentherapeutisch wirksame Nukleinsäure(n), komplexiert mit einem TZBP-Polykation-Konjugat (TZBP-Polykation-Konjugat und Nukleinsäure können auch getrennt vorliegen und unmittelbar vor der therapeutischen Anwendung komplexiert werden).

Als therapeutisch wirksame Nukleinsäuren kommen die bereits angeführten Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme bzw. die dafür kodierenden Gene oder für trans-dominante Mutanten kodierende Gene in Betracht, die inhibierende Wirkung auf in in den jeweiligen Zielzellen enthaltene endogene oder exogene Gene oder Genprodukte haben. Darunter sind z.B. diejenigen Gene zu verstehen, die aufgrund ihrer Sequenzspezifität (Komplementarität zu Zielsequenzen, Kodierung für trans-dominante Mutanten (Herskowitz, 1987)) eine intrazelluläre Immunität (Baltimore, 1988) gegen HIV bewirken und bei der Therapie des AIDS-Syndroms

oder zur Verhinderung der Aktivierung des Virus nach der Infektion verwendet werden können.

Die pharmazeutischen Zubereitungen können verwendet werden, um im menschlichen oder tierischen Organismus virale Sequenzen, z.B. HIV oder verwandte Retroviren zu inhibieren. Ein Beispiel für die therapeutische Anwendung durch Inhibierung eines verwandten Retrovirus ist die Behandlung der proliferativen T-Zelleukämie, die durch das HTLV-1 Virus hervorgerufen wird.

Neben der Behandlung viraler T-Zelleukämien kommt für die Anwendung der vorliegenden Erfindung auch die Therapie nicht-viraler Leukämien in Betracht. Die Beteiligung von Onkogenen (abl, bcr, Ha, Ki, ras, rat, c-myc, N-myc) an der Entstehung lymphatischer Leukämien wurde in jüngster Zeit nachgewiesen; die Existenz weiterer Onkogene wird aufgrund von beobachteten spezifischen Chromosomentranslokationen für wahrscheinlich erachtet. Die Klonierung dieser Oncogene bietet die Grundlage für die Konstruktion oncogen-inhibierender Nukleinsäuremoleküle und damit für eine weitere therapeutische Einsatzmöglichkeit der vorliegenden Erfindung.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Gentherapie. Prinzipiell können im Rahmen der Gentherapie mit Hilfe der vorliegenden Erfindung all diejenigen Gene bzw. Abschnitte davon in ein T-Zelloberflächenprotein exprimierende Zielzellen eingeführt werden, deren Expression in diesem Zelltyp einen therapeutischen Effekt erzielt, z.B. durch Substitution genetisch bedingter Defekte oder Auslösen einer Immunantwort.

Obwohl das Schwergewicht in der Anwendung der Erfindung auf Vertreter von Zellen der T-Lymphozyten-Abstammungslinie gelegen ist, kann sie natürlich auch auf Vertreter anderer Zellspezies, sofern diese Zellen das T-Zelloberflächenprotein exprimieren, angewendet werden.

### Figurenübersicht

**Fig.1:** Import von anti-CD4-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup>-CHO-Zellen

**Fig.2:** Import von anti-CD4-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup>-CHO-Zellen

**Fig.3:** Import von gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen

**Fig.4:** Import von gp120-Polylysin190/pRSVL-Komplexen, enthaltend nicht-kovalent gebundenes Poly(D)Lysin240, in CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen

**Fig.5:** Import von gp120-Polylysin120/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup> HeLa-Zellen

**Fig.6:** Transfer und Expression von DNA in H9-Zellen mittels antiCD7-Polylysin190-Konjugaten

**Fig.7:** Transfektion von CD4<sup>+</sup>-Zellen mit Protein A-Polylysin-Konjugaten

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele illustriert.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von AntiCD4-Polylysin 90-Konjugaten

Die Kopplung erfolgte analog literaturbekannter Methoden durch Einführung von Disulfidbrücken nach Modifizierung mit Succinimidyl-Pyridyldithio-propionat (SPDP, Jung et al., 1981).

Eine Lösung von 1,7 mg antiCD4-Antikörper (OKT4A, Ortho Diagnostic Systems) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,8 wurde mit 11 µl 10 mM ethanolischer Lösung von SPDP (Pharmacia) versetzt.

Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer pH 7,3), wobei 1,4 mg antiCD4, modifiziert mit 75 nmol Pyridyldithiopropionatresten, erhalten wurden.

Poly(L)lysin 90 (durchschnittlicher Polymerisationsgrad von 90 Lysinresten (Sigma), Fluoreszenzmarkierung mittels FITC) wurde analog mit SPDP modifiziert und durch Behandlung mit Dithiothreitol und nachfolgender Gelfiltration in die mit freien Mercaptogruppen modifizierte Form gebracht.

Eine Lösung von 38 nmol Polylysin 90, modifiziert mit 120 nmol Mercaptogruppen, in 0,5 ml 20 mM Natriumacetatpuffer, wurde unter Sauerstoffausschluß mit oben angeführtem modifiziertem antiCD4 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Gelpermeations-chromatographie (Superose 12, 500 mM Guanidinium-hydrochlorid, pH 7,3); nach Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden entsprechende Konjugate, bestehend aus 1,1 mg antiCD4-Antikörper, modifiziert mit 11 nmol Polylysin 90, erhalten.

## Beispiel 2

### Herstellung von AntiCD4-Polylysin 190-Konjugaten

Eine Lösung von 1,0 mg (6.25nmol) antiCD4-Antikörper (OKT4A, Ortho Diagnostic Systems) in 0,3 ml 50 mM HEPES pH 7,8 wurde mit 37 µl 1 mM ethanolischer Lösung von Succinimidyl-Pyridyldithio-propionat (SPDP, Pharmacia) versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer pH 7,9), wobei 0,85 mg (5,3 nmol) antiCD4, modifiziert mit 30 nmol Pyridyldithiopropionatresten, erhalten wurden. Poly(L)lysin190 (durchschnittlicher

Polymerisationsgrad von 190 Lysinresten (Sigma), Fluoreszenzmarkierung mittels FITC) wurde analog mit SPDP modifiziert und durch Behandlung mit Dithiothreitol und nachfolgender Gelfiltration in die mit freien Mercaptogruppen modifizierte Form gebracht. Eine Lösung von 7,7 nmol Polylysin190, modifiziert mit 25 nmol Mercaptogruppen, in 0,13 ml 30 mM Natriumacetatpuffer wurde unter Sauerstoffausschluß mit oben angeführtem modifiziertem antiCD4 (in 0,5 ml 300mM HEPES pH 7,9) gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5 M NaCl auf einen Gehalt von ungefähr 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50 mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Dialyse gegen 10 mM HEPES pH 7,3 wurden entsprechende Konjugate, bestehend aus 0,35 mg (2,2 nmol) antiCD4-Antikörper, modifiziert mit 3,9 nmol Polylysin190, erhalten.

### Beispiel 3

#### Herstellung von gp120-Polylysin 190-Konjugaten

Die Koppelung erfolgte analog literaturbekannter Methoden entweder durch Einführung von Disulfidbrücken nach Modifizierung mit Succinimidyl-Pyridyldithiopropionat im Falle der antiCD4-Konjugate) oder durch Thioether-Verknüpfung nach Modifizierung mit 6-Maleimidocapronsaeure-N-hydroxysuccinimidester (EMCS, Sigma) (Fujiwara et al., 1981).

**a) Disulfidverknüpfte gp120-Polylysin 190-Konjugate:**

Eine Lösung von 3 mg rekombinantem gp120 (hergestellt nach der von Lasky et al., 1986, beschriebenen Methode) in 50 mM HEPES pH 7,8 wurde mit 7  $\mu$ l 10 mM ethanolischer Lösung von SPDP versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer pH 7,9) und man erhielt dabei 2,8 mg (23 nmol) rgp120, modifiziert mit 67 nmol Pyridyldithiopropionatresten.

Eine Lösung von 6,6 nmol Polylysin 190, fluoreszenzmarkiert und wie oben für die antiCD4-Konjugate beschrieben, modifiziert mit 23 nmol Mercaptogruppen, in 120  $\mu$ l 30 mM Natriumacetat wurde unter Sauerstoffausschluß mit dem modifizierten rgp120 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5M NaCl auf einen Gehalt von ungefähr 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50 mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Fraktionierung und Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden zwei Konjugatfraktionen A und B, bestehend aus 0,33 mg rgp120 modifiziert mit 1,3 nmol Polylysin 190 (im Falle der Fraktion A), bzw. 0,34 mg rgp120 modifiziert mit 3,2 nmol Polylysin 190 (Fraktion B) erhalten.

**b) Thioether-verknüpfte gp120-Polylysin 190-Konjugate:**

Eine Lösung von 2 mg rekombinantem gp120 in 0,45 ml 100 mM HEPES pH 7,9 wurde mit 17  $\mu$ l einer 10 mM Lösung von EMCS in Dimethylformamid versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer 7,9). Die Produktlösung (1,2 ml) wurde sogleich unter

Sauerstoffausschluß umgesetzt mit einer Lösung von 9,3 nmol Polylysin 190, fluoreszenzmarkiert und wie oben (antiCD4-Konjugate) beschrieben modifiziert mit 30 nmol Mercaptogruppen (in 90 µl 30 mM Natriumacetat pH 5,0), und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5M NaCl auf einen Gehalt von ca. 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Fraktionierung und Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden drei Konjugatfraktionen A, B und C erhalten, bestehend aus 0,40 mg rgp120 modifiziert mit 1,9 nmol Polylysin 190 (im Falle der Fraktion A), bzw. 0,25 mg rgp 120 modifiziert mit 2,5 nmol Polylysin 190 (Fraktion B), bzw. 0,1 mg rgp 120 modifiziert mit 1,6 nmol Polylysin 190 (Fraktion C).

#### Beispiel 4

##### Herstellung von AntiCD7-Polylysin190-Konjugaten

Eine Lösung von 1,3 mg antiCD7-Antikörper (Immunotech) in 50 mM HEPES pH 7,9 wurde mit 49 µl 1 mM ethanolischer Lösung von SPDP (Pharmacia) versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 50 mM HEPES-Puffer pH 7,9) wobei 1,19 mg (7,5 nmol) antiCD7, modifiziert mit 33 nmol Pyridyldithiopropionatresten, erhalten wurden. Poly(L)lysin190, Fluoreszenzmarkierung mittels FITC, wurde analog mit SPDP modifiziert und durch Behandlung mit Dithiothreitol und nachfolgender Gelfiltration in die mit freien Mercaptogruppen modifizierte Form gebracht.

Eine Lösung von 11 nmol Polylysin190, modifiziert mit 35 nmol Mercaptogruppen, in 0,2 ml 30 mM Natriumacetatpuffer wurde unter Sauerstoffausschluß mit oben angeführtem modifiziertem antiCD7 (in 0,5 ml 300mM HEPES pH 7,9) gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5 M NaCl auf einen Gehalt von ungefähr 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50 mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Dialyse gegen 10 mM HEPES pH 7,3 wurden entsprechende Konjugate, bestehend aus 0,51 mg (3,2 nmol) antiCD7-Antikörper, modifiziert mit 6,2 nmol Polylysin190, erhalten.

#### Beispiel 5

#### Herstellung von Komplexen von Antikörper-Polykation-Konjugaten mit DNA

Die Komplexe wurden hergestellt, indem verdünnte Lösungen von DNA (30 µg/ml oder weniger in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,3) mit den in den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Antikörper-Polylysin-Konjugaten (100 µg/ml oder weniger) vermischt wurden. Als DNA wurde pRSVL Plasmid-DNA (De Wet et al., 1987) verwendet, hergestellt mittels Triton-X Lyse Standard-Methode (Maniatis, 1982), gefolgt von CsCl/EtBr Gleichgewichtsdichthegradienten-Zentrifugation, Entfärbung mit Butanol-1 und Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA. Um ein Ausfällen der DNA-Komplexe zu verhindern, wurde phosphatfreier Puffer verwendet (Phosphate verringern die Löslichkeit der Konjugate).

## Beispiel 6

Transfer und Expression von DNA in CD4+ CHO-Zellen mittels antiCD4-Polylysine90-Konjugaten

In diesem und den folgenden Beispielen wurde Plasmid-DNA, enthaltend das Photinus pyralis-Luciferase-Gen als Reporter-Gen, verwendet, um Gentransfer und Expression zu untersuchen. In den Figuren, die die Ergebnisse der Versuche darstellen, beziehen sich die dargestellten Werte für die Luciferase-Aktivität auf die Aktivität der gesamten Zellprobe.

CD4+ CHO-Zellen (Lasky et al., 1987) wurden zu 5x105 Zellen pro T-25-Flasche in Ham's F-12-Medium (Ham, 1965) plus 10 % FCS (fötales Kälberserum) ausgesät.

18 h später wurden die Zellen zweimal mit Ham's F-12-Medium ohne Serum gewaschen und in diesem Medium (5 ml) 5 h lang bei 37°C bebrütet.

Anti-CD4-Polylysine/PRSVL Komplexe wurden bei Endkonzentrationen von DNA von 10 µg/500 µl in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5 hergestellt, wie in Beispiel 5 beschrieben. Anti-CD4-Polylysine 90 (8,4 nmol Polylysine90/mg anti-CD4) wurde in den angegebenen Masse-Verhältnissen (von 1,9 bis 8,1, ausgedrückt als Masse von anti-CD4) eingesetzt. In den Proben 1 - 4 wurden die Komplexe den Zellen in Ham's F-12-Medium ohne Serum, enthaltend 100 µM Chloroquin zugefügt; in den Proben 5 und 6 wurde Chloroquin weggelassen. Nach einer 4stündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium plus 10 % FCS gewaschen und in diesem Medium inkubiert. In den Proben 5 und 6 wurde dasselbe Volumen an Serum enthaltendem Medium zu den Zellen gefügt. Nach 20 h wurden alle Zellen mit

frischem, Serum enthaltendem Medium gewaschen und 48 h später geerntet. Aliquots von Extrakten (ca. 1/5 jeder Probe, entsprechend gleicher Proteinmenge, wurden auf Luciferase-Aktivität untersucht (De Wet et al., 1987). Die Bioluminiszenz wurde unter Verwendung des Clinilumats (Berthold, Wildbach, BRD) gemessen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Fig.1 dargestellt. Es zeigte sich, daß DNA mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate in CD4<sup>+</sup>-Zellen importiert wird und die importierte DNA exprimiert wird, wobei die Effizienz des DNA-Imports proportional dem anti-CD4/Polylysin-Gehalt ist.

#### Beispiel 7

#### Transfer und Expression von DNA in CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen mittels antiCD4-Polylysin190-Konjugaten

Zunächst wurden CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen gezüchtet, wie in Beispiel 6 angegeben. Konjugat/DNA -Komplexe, hergestellt wie in Beispiel 5 angegeben, enthaltend 10 $\mu$ g pRSVL und entweder einen 2:1 oder 3:1 Massenüberschuß an antiCD4-Polylysin 90 (s. Beispiel 1) oder gp120-Polylysin (s. Beispiel 3), wie in Fig.2 angegeben, wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 $\mu$ M Chloroquin den Zellen hinzugefügt. Nach weiteren 4 h bei 37°C wurden die Proben mit Chloroquin zweimal mit Ham's Medium, enthaltend 10% fötales Kälberserum gewaschen, während den Proben ohne Chloroquin 5 ml desselben Mediums zugefügt wurden. Die Zellen wurden weitere 20 h bei 37°C inkubiert und Aliquots auf Luciferaseaktivität untersucht, wie in Beispiel 6 angegeben. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Fig. 2.

## Beispiel 8

Import von gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen

## a) Herstellung von gp120-Polylysin/DNA-Komplexen

Die Komplexe wurden hergestellt, indem zunächst 6 µg DNA in 330 µl HBS bei Raumtemperatur verdünnt wurden (100 µg/ml oder weniger). Als DNA wurde pRSVL Plasmid-DNA verwendet (vgl. Beispiel 5). Aliquots der gp120-pL190 Konjugate (die Mengen sind in Fig. 3 angegeben) wurden in 170 µl HBS verdünnt. Die jeweilige Konjugatverdünnung wurde rasch der DNA-Verdünnung hinzugefügt, 30 min inkubieren gelassen und anschließend für die Transfektion verwendet.

b) Transfektion von CD4<sup>+</sup> Zellen

CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen (Lasky et al., 1987) wurden zu 6x10<sup>5</sup> Zellen pro T-25-Flasche in Ham's F-12-Medium (Ham, 1965) plus 10 % FCS (fötales Kälberserum) ausgesät.

18 h später wurden die Zellen zweimal mit Ham's F-12-Medium ohne Serum gewaschen und in diesem Medium (5 ml) 5 h lang bei 37°C bebrütet. Darauf hin wurden die Lösungen der gp120-pL/pRSVL Komplexe den Zellen beigegeben. Nach 4 Stunden wurde ein gleiches Volumen DME-Medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium) mit einem Gehalt von 10 % fötalem Kälberserum zu jeder Probe gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, Extrakte hergestellt und Aliquots entsprechend gleichem Proteingehalt (ca. 1/5 des Gesamtmaterials) wie in den vorigen Beispielen auf Luciferaseaktivität untersucht. Die in Fig. 3 angegebenen Werte entsprechen der Luciferaseaktivität

von  $6 \times 10^5$  Zellen. Es wurde festgestellt, daß die Aktivität der gp120-pL Konjugate vom Verhältnis der Komponenten abhängt, wobei größere Aktivität bei den Konjugaten mit niedrigem gp120 : Polylysin-Verhältnis (Fraktion C, Spuren 5 und 6) und eine sehr geringe oder keine Aktivität bei der Fraktion mit einem hohen gp120 : Polylysin-Verhältnis (Fraktion A, Spuren 1 und 2) festgestellt wurde.

#### Beispiel 9

Import von gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen, enthaltend nicht-kovalent gebundenes Polylysin, in CD4<sup>+</sup> CHO-Zellen

Diejenigen gp120-pL Konjugate, die im Beispiel 8 schlechte Ergebnisse bei der Transfektion gezeigt hatten (Fraktionen A und B) wurden daraufhin untersucht, ob ein Zusatz von freiem Polylysin die DNA-Aufnahme verbessern kann. Es wurden 6 µg DNA und 12 µg Konjugat verwendet, wobei dem Konjugat jeweils vor der Komplexierung mit DNA 1 oder 3 µg Polylysin240 zugesetzt wurden. Übereinstimmend mit den für die Transferrin-Konjugate erhaltenen Ergebnissen wurde eine starke Zunahme der Luciferase-Aktivität (260-fach oder 5,2-fach) beobachtet (Fig. 4).

#### Beispiel 10

Import von gp120-Polylysin120/pRSVL-Komplexen in CD4<sup>+</sup> HeLa-Zellen

CD4<sup>+</sup>HeLa Zellen (Maddon et al., 1986) oder normale HeLa-Zellen als Kontrolle in DME-Medium plus 10 % FCS wurden zu  $6 \times 10^5$  Zellen pro T25-Flasche ausgesät und

anschließend gezüchtet, wie in Beispiel 6 für CHO-Zellen angegeben.

Die Zellen wurden mit gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen bei den angegebenen Konjugat/DNA-Verhältnissen (Fig.5) in Berührung gebracht (bei den gp120-Polylysin-Konjugaten A, B und C handelt es sich um drei Fraktionen einer Mono S-Auftrennung des konjugierten Materials aus Beispiel 3b)). Das molare gp120 : Polylysin-Verhältnis jeder Fraktion ist in der Figur angegeben. Nach 4stündigem Kontakt mit den Konjugaten in Abwesenheit von Serum wurde Serum enthaltendes Medium zugesetzt und die Zellen nach 20 h geerntet.

Aus den Zellextrakten wurden Aliquots, standardisiert auf gleichen Proteingehalt, auf Luciferase-Aktivität untersucht. Die in der Figur angegebenen Werte entsprechen der Luciferase-Aktivität von  $6 \times 10^5$  Zellen, transfiziert mit 6  $\mu\text{g}$  DNA.

#### Beispiel 11

Transfer und Expression von DNA in H9-Zellen mittels antiCD7-Polylysin190-Konjugaten

a) Zellen der T-Zelllinie H9 (Mann et al., 1989) wurden in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 20 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin und 1 mM Glutamin gezüchtet. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und zu 100.000 Zellen/ml in frisches Medium aufgenommen (1.000.000 Zellen pro Probe) die zur Transfektion verwendet wurden. Zum Vergleich mit antiCD7-Konjugaten wurden Transferrin-Konjugate verwendet. Transferrin-Polylysin-Konjugate wurden hergestellt, wie in der EP-A 1 388 758 beschrieben;

als antiCD7-Konjugate wurden die in Beispiel 4 beschriebenen verwendet. Die Komplexierung mit DNA wurde vorgenommen, wie in Beispiel 5 angegeben. Für die transiente Transfektion in H9-Zellen wurde als DNA das Plasmid pHLuci verwendet, das die HIV-LTR-Sequenz, verbunden mit der für Luciferase kodierenden Sequenz, gefolgt von der SV40-Intron/polyA-Stelle, enthält: Das HindIII-Fragment, enthaltend das Protease 2A-Gen, von pHIV/2A (Sun und Baltimore, 1989) entfernt und durch ein HindIII/SmaI-Fragment von pRSVL (De Wet et al., 1987), enthaltend die für Luciferase kodierende Sequenz, ersetzt. Die beiden Fragmente wurden über die HindIII-Stellen (nach Herstellen glatter Enden mittels Klenow-Fragment) verbunden und dann über die glatte SmaI-Stelle mit der nunmehr glatten HindIII-Stelle verbunden. Ein Klon mit der richtigen Orientierung der Luciferase-Gensequenz wurde ausgewählt. Dieses Plasmid benötigt für starke Transkriptionsaktivität das TAT-Gen-Produkt. Dieses wird durch Co-Transfektion mit dem Plasmid pCMVTAT, welches für das HIV-TAT-Gen unter der Kontrolle des CMV immediate early promoter kodiert (Jakobovits et al., 1990) bereitgestellt. Die für die Transfektion verwendeten DNA-Komplexe enthielten eine Mischung von 5 µg pHLuci und 1 µg pCMVTAT. Die DNA/Polykation-Komplexe (500 µl) wurden zu der 10 ml Zellprobe hinzugegeben und 4 h lang in Gegenwart von 100 µM Chloroquin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium gewaschen, 40 h später geerntet und auf Luciferase-Aktivität untersucht, wie in den vorangegangenen Beispielen angegeben. Die Ergebnisse (in Luciferase-Lichteinheiten) sind in Fig. 6 dargestellt: Es zeigte sich, daß die Luciferase-Aktivität mit steigenden Mengen von antiCD7-Polylysin-Konjugat, komplexiert mit 6 µg DNA, zunimmt (Proben 1, 2 und 3). Eine weitere Steigerung der Aktivität wurde beobachtet, wenn 6 µg Konjugat zusammen mit 1 µg freiem

Polylysin zur Komplexbildung verwendet wurden (Probe 4), ein weiterer Zusatz von Polylysin beeinträchtigte den Gen-Transport (Probe 5). ( Die mit Transferrin-Polylysin-Konjugaten durchgeföhrten Vergleichsversuche sind mit 6 und 7 bezeichnet.)

b) Eine weitere Versuchsreihe zur Transfektion mit Hilfe der Antikörper-Konjugate wurde unter Verwendung des Plasmids pSSTNEO durchgeföhr. Dieses Plasmid, das ein Neomycin-Resistenz-Gen als Marker enthält, wurde unter Verwendung von antiCD4-, antiCD7- und (zum Vergleich) Transferrin-Polylysin190-Konjugaten in H9-Zellen eingeföhrt (es wurden 6 µg DNA pro 10<sup>6</sup> Zellen verwendet; die optimalen Transfektionsbedingungen waren in Vorversuchen mit Hilfe transienter Luciferase - Assays ermittelt worden). Das Plasmid pSSTNEO enthält das große Sst-Fragment des pUCu-Locus (Collis et al., 1990), der die HSV TK-neo-Einheit enthält. Ein 63 bp-Fragment, enthaltend eine einzige NdeI-Stelle war in die Asp718-Stelle eingeföhrt worden. Aliquots der transfizierten Zellen (enthaltend eine definierte Zellzahl) wurden daraufhin in ein halbfestes Methylcellulose-Medium, enthaltend 1000 µg/ml G418, verdünnt. Dazu wurden Aliquots der Zellen 3 Tage nach Transfektion mit DNA, enthaltend den Neomycin-Marker, in ein halbfestes Medium, das zusätzlich zu den normalen Anforderungen 0,5 - 1 mg/ml G418 und 20 mg/ml Methylcellulose enthielt, ausplattiert. (Zur Herstellung des halbfesten Selektionsmediums wurde unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 20 g Methylcellulose in 460 ml Wasser hergestellt.) Daraufhin wurden 500 ml doppelt konzentriertes, ergänztes Nährmedium, ebenfalls hergestellt unter sterilen Bedingungen, mit der Methylcellulose-Lösung vereinigt, das Volumen auf 1 l gebracht und das Medium über Nacht bei 4°C geröhrt. 50 ml Aliquots dieses

Mediums wurden, gegebenenfalls nach Lagerung bei -20°C, mit je 10 ml Serum versetzt und das Volumen mit Komplettmedium ohne Serum auf 100 ml gebracht. In diesem Schritt wurde G418 hinzugefügt. Ein 2,5 ml Aliquot des Methylcellulose-Mediums wurde mit einem 50 bis 100 µl Aliquot der Zellsuspension vermischt und ca. 1 ml dieser Mischung in Kulturschalen ausgegossen. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Ca. 10 bis 14 Tage später wurden die G418-resistenten Zellen gezählt (nur Kolonien mit mehr als 200 Zellen wurden als positiv gewertet). Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt (es ist die Zahl von G418 resistenten Kolonien/1000 Zellen 10 Tage nach Einbringen in das Antibiotika-Medium aufgetragen).

### Beispiel 12

#### Herstellung von Protein-A-Polylysin190-Konjugaten

Eine Lösung von 4,5 mg Protein-A (Pierce, No. 21182, 107 nmol) in 0,5 ml 100 mM HEPES pH 7,9 wurde mit 30 µl 10 mM ethanolischer Lösung von SPDP (Pharmacia) versetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 50 mM HEPES-Puffer pH 7,9) wobei 3,95 mg (94 nmol) Protein-A, modifiziert mit 245 nmol Pyridyldithiopropionatresten, erhalten wurden. Poly(L)lysin190, Fluoreszenzmarkierung mittels FITC, wurde analog mit SPDP modifiziert und durch Behandlung mit Dithiothreitol und nachfolgender Gelfiltration in die mit freien Mercaptogruppen modifizierte Form gebracht.

Eine Lösung von 53 nmol Polylysin190, modifiziert mit 150 nmol Mercaptogruppen, in 0,8 ml 30 mM Natriumacetatpuffer wurde unter Sauerstoffausschluß mit oben angeführtem modifiziertem Protein-A gemischt und

über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5 M NaCl auf einen Gehalt von ungefähr 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50 mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Fraktionierung und Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden zwei Konjugatfraktionen A und B, bestehend aus 1,15 mg (27 nmol) Protein-A, modifiziert mit 5 nmol Polylysin190 (im Falle der Fraktion A) bzw. 2,6 mg (6,2 nmol) Protein-A, modifiziert mit 40 nmol Polylysin190 (Fraktion B), erhalten. Die Komplexe mit DNA wurden analog Beispiel 5 hergestellt.

### Beispiel 13

#### Transfektion von CD4<sup>+</sup> Zellen mit Protein A-Polylysin-Konjugaten

CD4-exprimierende HeLa-Zellen (s. Beispiel 10) wurden zu  $6 \times 10^5$  Zellen/T25-Flasche ausgesät und anschließend in DME-Medium plus 10 % FCS gezüchtet. Wie in Fig. 7 angegeben, wurden die Zellen mit dem Antikörper (anti-CD4gp55kD, IOT4, Immunotech) (3 µg/Probe) 1 h lang bei Raumtemperatur vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurden Protein A-Polylysin190/DNA-Komplexe in 500 µl HBS, enthaltend 6 µg pRSVL und die angegebenen Mengen Protein A-Polylysin190 plus zusätzliches freies Polylysin, wie in Beispiel 5 hergestellt. Nach Ende der 1stündigen Inkubation wurden die Zellen in 4,5 ml frisches Medium gegeben und die 500 µl DNA-Probe bei 37°C zu den Zellen zugegeben. Nach 4 h wurden diejenigen Proben, die 100 µM Chloroquin enthielten (Proben 9-12) in frisches Medium gewaschen,

während die Proben 1-8 bis zur Ernte mit der DNA inkubiert wurden. Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen 20 h später geerntet. Die Ergebnisse der Versuche sind in Fig. 7 dargestellt. Es zeigte sich, daß die Luciferase-Aktivität von der Gegenwart von Protein A-Polylysin im DNA-Komplex abhängig war (Proben 1-4, 5, 6). Bei den Proben 5-8, 11, 12 wurde DNA-Transport mittels des Protein A-Komplexes ohne Antikörper-Vorbehandlung nachgewiesen; der DNA-Import wurde jedoch um ca. 30 % gesteigert, wenn die Zellen mit dem Antikörper, der das Zelloberflächenprotein CD4 erkennt, vorbehandelt wurden (Proben 1-4, 9, 10). Es wurde weiters festgestellt, daß die Anwesenheit von Chloroquin keine Steigerung der DNA-Expression hervorruft (vgl. die Proben 1-8 mit den Proben 9-12).

## Literatur:

Aruffo A. und Seed B., 1987, EMBO J. 6, No. 11,  
3313-3316

Baltimore D., 1988, Nature 335, 395

Chaudhary V.K. et al., 1990, Proc.Natl.Sci.USA 87,  
1066

Collis P. et al., 1990, EMBO J. 9, 233-240.

Dalgleish A.G. et al., 1984, Nature 312, 763

De Wet et al., 1987, Mol.Cell.Biol. 7, 725-737

Fauci A., 1988, Science 239, 617

Felsenfeld et al., 1978, Nature 271, 115

Fujiwara et al., 1981, J.Immunol.Meth. 45, 195

Green M. et al., 1989, Cell 58, 215-223

Ham R.G., 1965, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 53, 288

Herskowitz I., 1987, Nature 329, 219

Jakobovits A. et al., 1990, EMBO J. 9, 1165-1170

Johnston S.A., 1990, Nature 346, 776-777

Jung et al., 1981, Biochem.Res.Commun.101, 599

Kasid A. et al., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,  
473-477

Klatzmann D. et al., 1984, Nature 312, 767

Lasky et al., 1986, Science 233, 209-212

Lasky et al., 1987, Cell 50, 975-985

Luthmann und Magnussen, 1983, Nucl.Acids Res.11  
1295-1308

Maddon P.J. et al., 1986, Cell 47, 333-348

Malim M. et al., 1989, Cell 58, 205-214

Maniatis, 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor

Mann D.L. et al., 1989, AIDS Research and Human  
Retroviruses, 5, 253

McDougal J.S. et al., 1986, Science 231, 382

Nabel E.G. et al., 1990, Science 249, 1285-1288

Nygren A. et al., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,  
6543-6546

Orlandi R. et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,  
3833-3837

Pauza C.D. und Price T.M., 1988, J.Cell Biol. 107,  
959-968

Pelchen-Matthews et al., 1989, EMBO J.8, 3641-3649

Sastry L. et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,  
5728-5732

Smith D.H. et al., 1987, Science 238, 1704-1707

Stein B.S. et al., 1987, Cell 49, 659

Surolia A. et al., 1982, TIBS 7, 74-75

Trono D. et al., 1989, Cell 59, 113-120

Warrant R. et al., 1978, Nature 271, 130-135

Wilson J.M. et al., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,  
439-443

Wu G.Y. und Wu C.H., 1987, J.Biol.Chem. 263,  
14621-14624

Yang N.S. et al., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,  
9568-9572

Zamecnik et al., 1986, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83,  
4143

Zon G., 1988, Pharmaceut. Research 5, No.9, 539-549

## Patentansprüche

1. Neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanalogen lösliche Komplexe zu bilden, die in menschliche oder tierische Zellen aufgenommen werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Proteinanteil der Konjugate ein Protein mit der Fähigkeit ist, an ein von Zellen der T-Zell-Abstammungslinie exprimiertes Zelloberflächenprotein zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in Zellen, die das T-Zelloberflächenprotein exprimieren, aufgenommen werden.
2. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Proteinanteil ein, vorzugsweise monoklonaler, Antikörper, bzw. ein Fragment davon, ist, gerichtet gegen das T-Zelloberflächenprotein.
3. Konjugate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein mit der Fähigkeit enthalten, an CD4 zu binden.
4. Konjugate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen monoklonalen Anti-CD4-Antikörper bzw. das Fragment davon enthalten, das ein gp120 bindendes Epitop aufweist.
5. Konjugate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Protein HIV-1 gp120 bzw. ein homologes Protein verwandter Retroviren oder ein Fragment davon enthalten, das an CD4 bindet.
6. Konjugate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein enthalten, das

an einen auf T-Zellen exprimierten Tumormarker bindet.

7. Konjugate nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein enthalten, das an CD7 bindet.
8. Konjugate nach einem der Ansprüche 2, 4, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Antikörper in direkt an das Polykation gekoppelter Form enthalten.
9. Konjugate nach einem der Ansprüche 2, 4, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Antikörper in über an Polykation gekoppeltes Protein A gebundener Form enthalten.
10. Protein A-Polykation-Konjugate zur Herstellung von Antikörper-Konjugaten nach Anspruch 9.
11. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein, gegebenenfalls modifiziertes, Protamin ist.
12. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein, gegebenenfalls modifiziertes, Histon ist.
13. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein synthetisches homologes oder heterologes Polypeptid ist.
14. Konjugate nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid Polylysin ist.

15. Konjugate nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ca. 20 bis 500 positive Ladungen aufweist.
16. Konjugate nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis T-Zell-bindendes Protein:Polykation etwa 10:1 bis 1:10 beträgt.
17. Neue Protein-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe, die in menschliche oder tierische Zellen aufgenommen werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Proteinanteil der Konjugate ein Protein mit der Fähigkeit ist, an ein von Zellen der T-Zell-Abstammungslinie exprimiertes Zelloberflächenprotein zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in Zellen, die das T-Zelloberflächenprotein exprimieren, aufgenommen werden.
18. Komplexe nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Konjugat-Anteil eines der in den Ansprüchen 1 bis 9 oder 11 bis 16 definierten Konjugate enthalten.
19. Komplexe nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein nicht-kovalent gebundenes Polykation, das gegebenenfalls identisch ist mit dem Polykation des Konjugats, derart enthalten, daß die durch das Konjugat erzielte Internalisierung und/oder Expression der Nukleinsäure gesteigert wird.
20. Komplexe nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine virusinhibierende Nukleinsäure enthalten.

21. Komplexe nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure enthalten, die Replikation und Expression des HIV-1 Virus oder verwandter Retroviren inhibiert.
22. Komplexe nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des HIV-1-Genoms aufweist.
23. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des tat-Gens aufweist.
24. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des rev-Gens aufweist.
25. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des nef-Gens aufweist.
26. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu LTR-Sequenzen aufweist.
27. Komplexe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zur tar-Sequenz aufweist.
28. Komplexe nach einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine inhibierende Nukleinsäure in Form eines Ribozyms, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-RNA, bzw. des dafür kodierenden Gens enthalten.

29. Komplexe nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure in Form einer genetischen Einheit, bestehend aus einem tRNA-Gen als Carrier-Gen und einem innerhalb dieses Gens angeordneten Ribozym-Gen, enthalten.
30. Komplexe nach einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine inhibierende Nukleinsäure in Form eines, gegebenenfalls modifizierten, Antisense-Oligonukleotids, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-Nukleinsäure, bzw. im Fall eines RNA-Oligonukleotids des dafür kodierenden Gens enthalten.
31. Komplexe nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure, kodierend für ein Virusprotein, das eine trans-dominante Mutation aufweist, enthalten.
32. Komplexe nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Oncogen-inhibierende Nukleinsäure enthalten.
33. Komplexe nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Oncogen-inhibierende Nukleinsäure in Form eines Ribozyms, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-RNA, bzw. des dafür kodierenden Gens enthalten.
34. Komplexe nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Oncogen-inhibierende Nukleinsäure in Form eines Ribozyms, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-RNA, bzw. des dafür kodierenden Gens enthalten.

35. Komplexe nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Nukleinsäure ein therapeutisch oder gentherapeutisch wirksames Gen bzw. einen Genabschnitt enthalten.
36. Verfahren zum Einführen von Nukleinsäure in Zellen, die ein T-Zelloberflächenprotein exprimieren, wobei man aus einem der in Ansprüchen 1 bis 9 oder 11 bis 16 definierten Protein-Polykation-Konjugat und Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Gegenwart von nicht-kovalent gebundenem Polykation, einen der in den Ansprüchen 17 bis 35 definierten, vorzugsweise unter physiologischen Bedingungen löslichen, Komplexe bildet und Zellen, die das T-Zelloberflächenprotein exprimieren, gegebenenfalls unter Bedingungen, unter denen der Abbau von Nukleinsäure in der Zelle inhibiert wird, mit diesem Komplex in Berührung bringt.
37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei man aus einem Protein A-Polykation-Konjugat, bestehend aus Protein A und einem der in den Ansprüchen 11 bis 15 definierten Polykationen und einer der in den Ansprüchen 20 bis 35 definierten Nukleinsäuren einen Komplex bildet und in Gegenwart eines Antikörpers, gerichtet gegen ein T-Zelloberflächenprotein, mit Zellen, die dieses Oberflächenprotein exprimieren, in Berührung bringt, wobei der Antikörper an den Konjugat-Anteil des Komplexes gebunden wird.
38. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend als wirksame Komponente eine oder mehrere therapeutisch oder gentherapeutisch wirksame

Nukleinsäure(n) in Form eines der in den  
Ansprüchen 17 bis 35 definierten Komplexe.

### Zusammenfassung

Neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit Nukleinsäuren oder Nukleinsäurenanalogen lösliche Komplexe zu bilden, enthalten als Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit, an ein von Zellen der T-Zell-Abstammungslinie exprimiertes Zelloberflächenprotein zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in Zellen, die das T-Zelloberflächenprotein exprimieren, aufgenommen werden. Komplexe für die Verwendung in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten eine therapeutisch oder gentherapeutisch wirksame Nukleinsäure.

Fig. 1

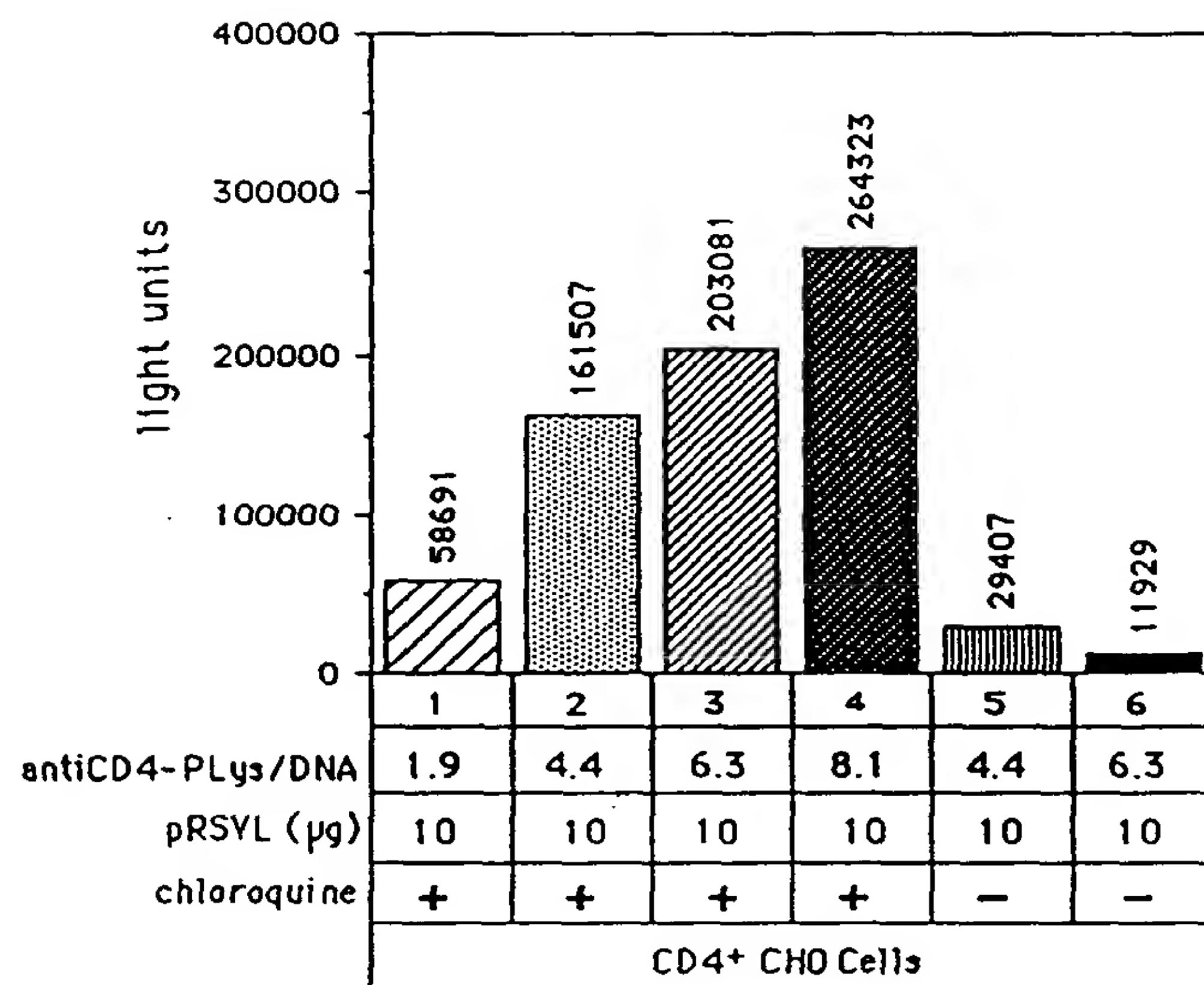


Fig. 2

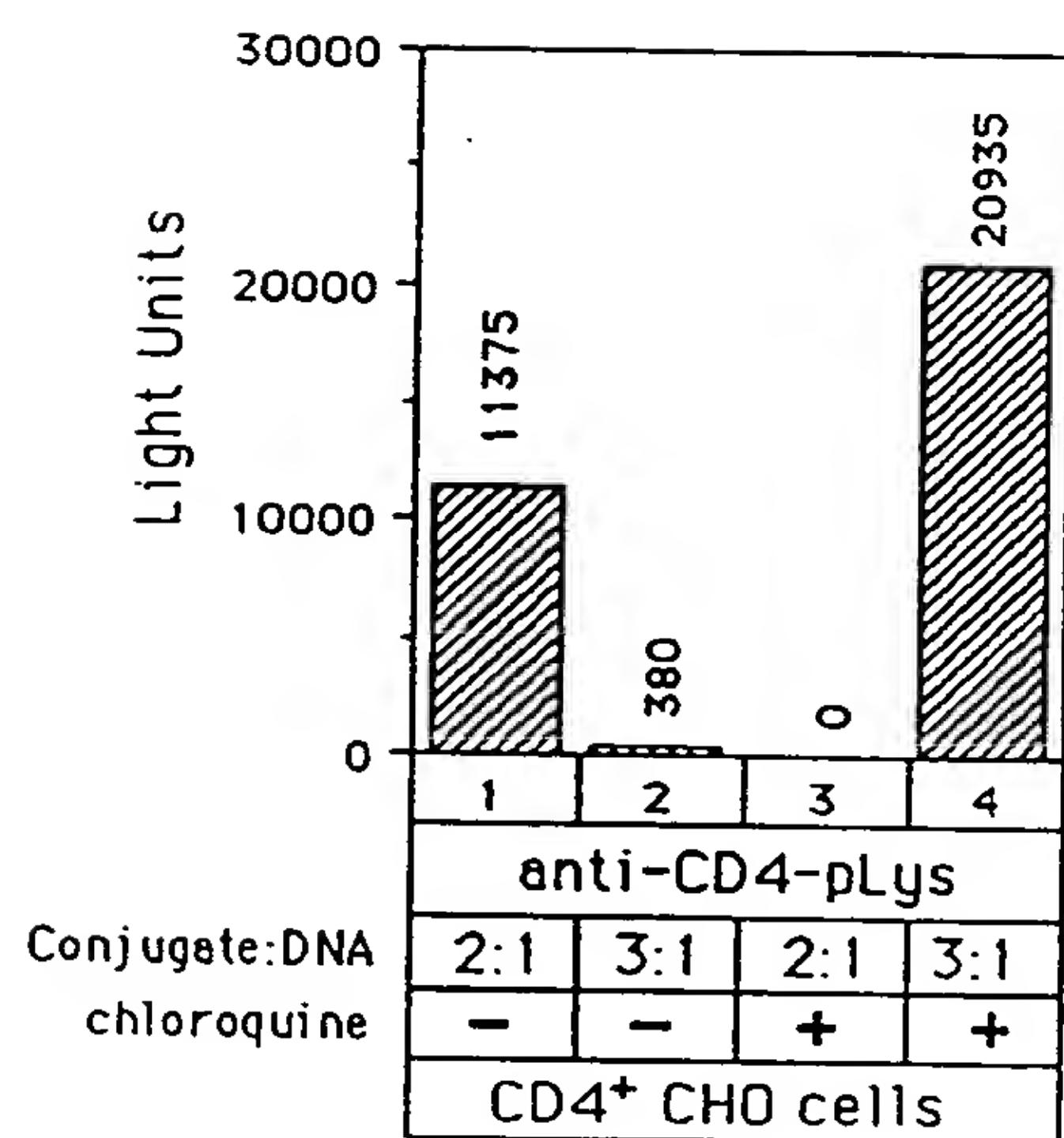


Fig. 3

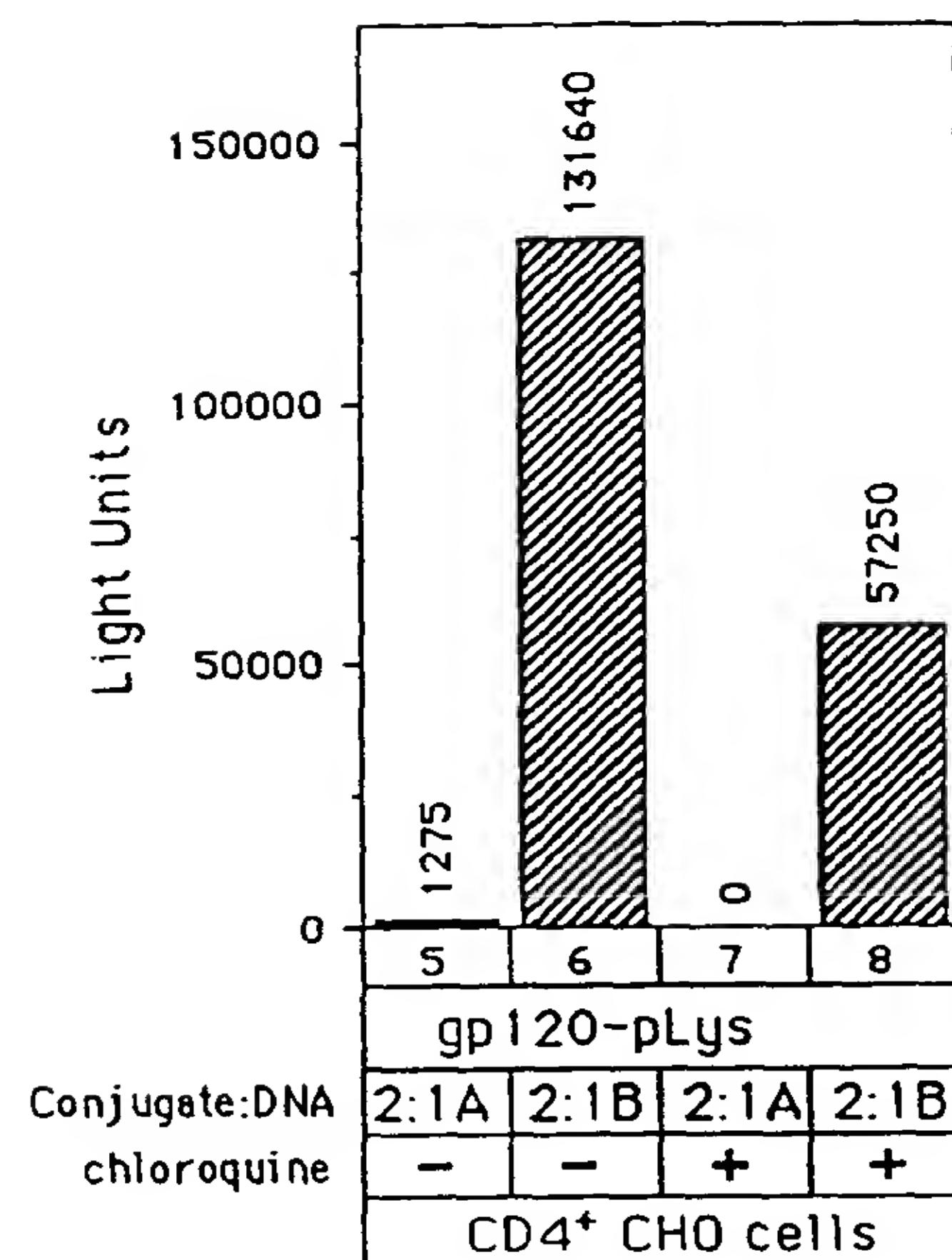


Fig. 4

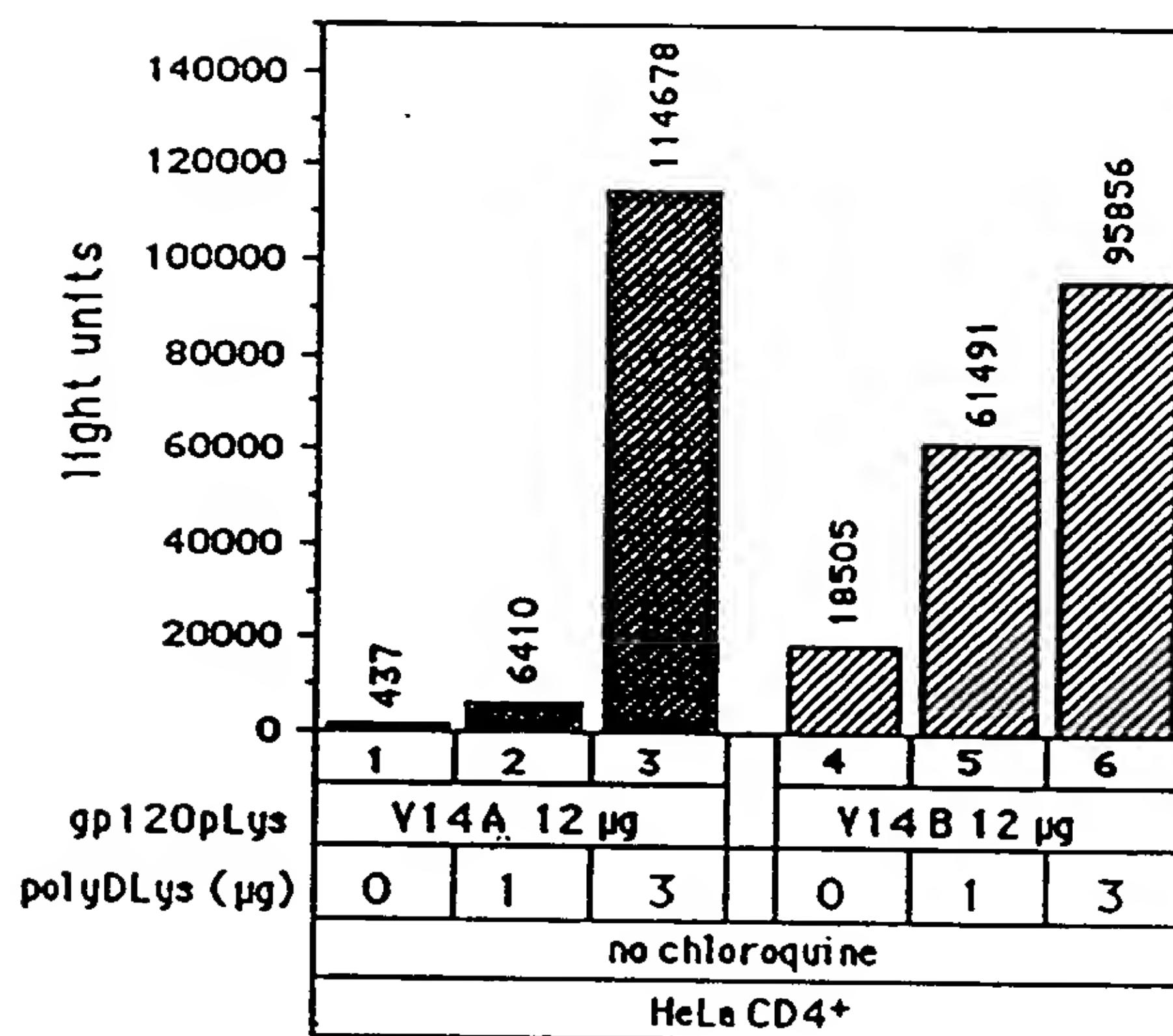


Fig. 5

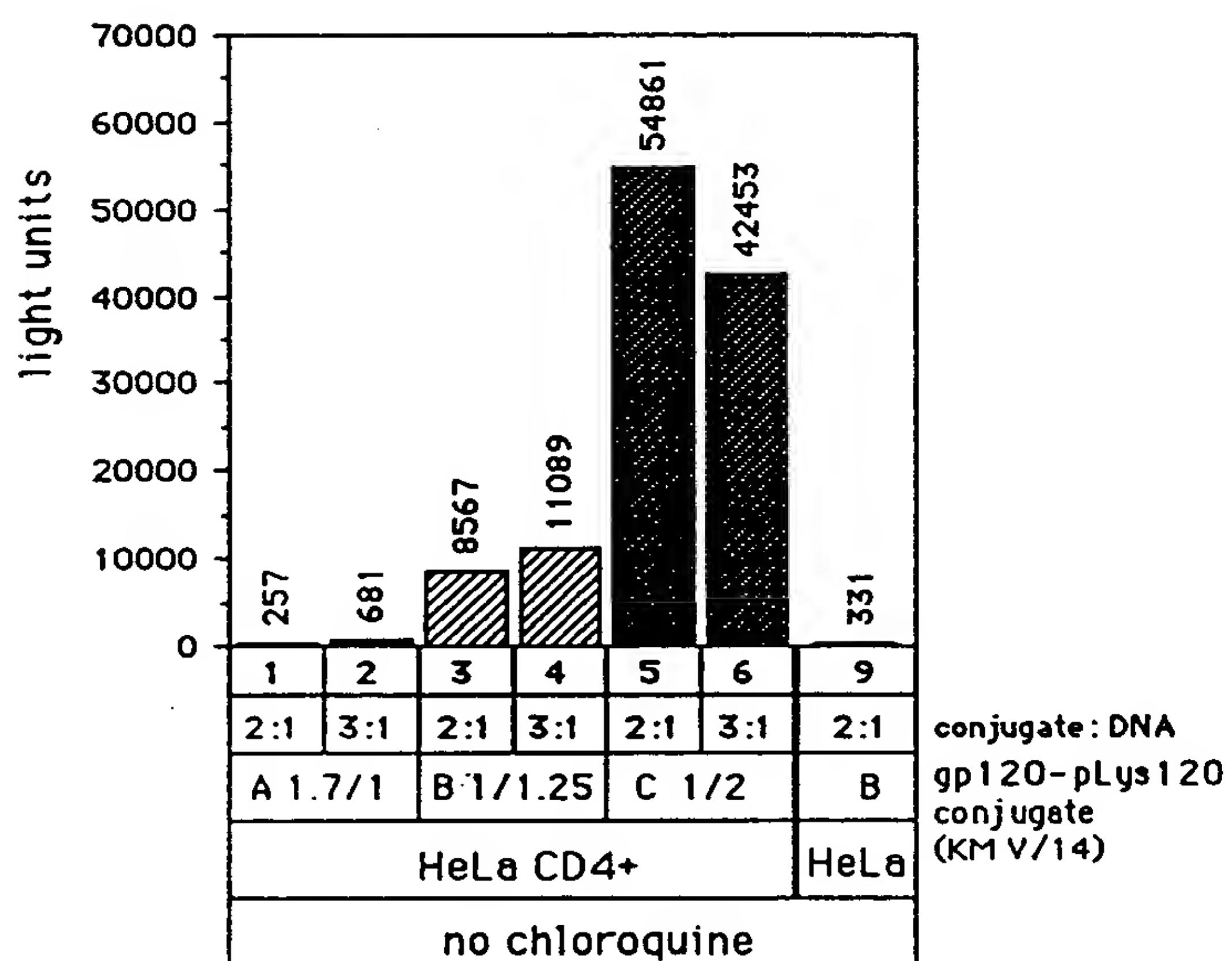


Fig. 6

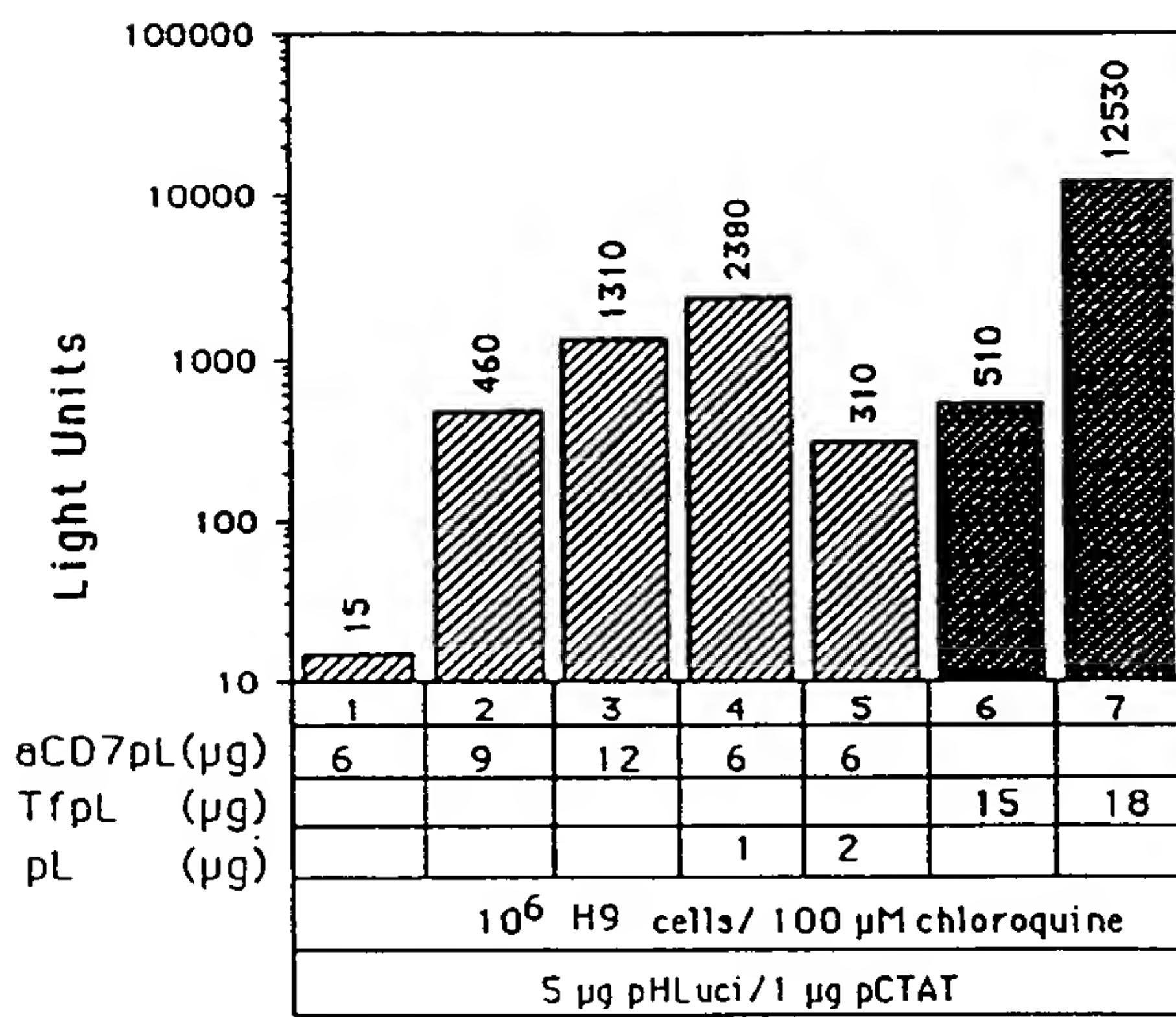


Fig. 7

